Untersuchungen zur Erhaltung leberspezifischer Funktionen und zur Regulation der Cholesterolbiosynthese in Primärkulturen von Hepatozyten erwachsener Ratten

I. Hillmar

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546803_0026

Untersuchungen zur Erhaltung leberspezifischer Funktionen und zur Regulation der Cholesterol-biosynthese in Primärkulturen von Hepatozyten erwachsener Ratten

Dissertation

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

I. Hillmar

aus Wuppertal

Tag der Einreichung:11.8.1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof.Dr.Cleve

2. Berichterstatter: Prof.Dr.Ziegelmeyer

Sondervotum: Prof.Dr. Barth

Tag der mündlichen Prüfung: 12.1.1981

Diese Arbeit entstand unter Leitung von Herrn Professor Barth von Mai 1977 - Januar 1980 im Labor der Forschergruppe Ernährung an der Medizinischen Poliklinik der Universität München.

Herrn Professor Barth und Herrn Professor Zöllner danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, Herrn Professor Barth und Herrn Professor Cleve für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung

Abkürzungen

Experimenteller Teil

I.) Methoden

1.) Zellkultur

2.) Desoxyribonukleinsäurebestimmung

3.) Proteinbestimmung nach Lowry

4.) Bestimmung der Glucose-6-Phosphatase-Aktivität

5.) Bestimmung der Tyrosin-Transaminase-Aktivität

6.) Glykogenbestimmung

7.) Glucosebestimmung

8.) Bestimmung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität

9.) Herstellen von Fettsäure-Albuminverbindungen

10.) Hormone- Lösungsmittel und Konzentrationen

11.) Methoden zur Entfernung nicht angehefteter Zellen aus Primärkulturen von Hepatozyten

II.) Material

1.) Geräte

2.) Versuchstiere und Futter

3.) Zellkultur und Medienkomponenten

4.) Chemikalien,nach Herstellern geordnet

5.) Enzyme und Coenzyme,nach Herstellern geordnet

6.) Hormone und Peptide, nach Herstellern geordnet

Ergebnisse

A Gluconeogenese in Primärkulturen von Hepatozyten

I.) Methodische Vorarbeiten

1.) Zelluläre Glykogenkonzentration im Verlauf einer 5-tägigen Kultur

2.) Hormonempfindlichkeit

a.) Glykogenolyse durch Adrenalin und Glucagon

b.) Erhöhung der Tyrosin-Transaminase-Aktivität durch Glucocorticoide (Dexamethasonphosphat)

II.) 1.) Gluconeogenese am 2. und 4. Tag der Kultur

2.) Glucose-6-Phosphatase-Aktivität im Verlauf einer 4-tägigen Kultur

3.) Gluconeogenese hormonbehandelter Kulturen am 2. und 4. Tag

B Regulation der HMG-CoA Reduktase-Aktivität durch Hormone und Substrate

1.) HMG-CoA Reduktase-Aktivität im Verlauf einer 4-tägigen Kultur

2.) Einfluß verschiedener Hormone auf die HMG-CoA Reduktase-Aktivität

3.) Einfluß von Ölsäure auf die HMG-CoA Reduktase-Aktivität

4.) Einfluß von anderen Fettsäuren auf die HMG-CoA Reduktase-Aktivität

Diskussion

Zusammenfassung

Literaturverzeichnis

Lebenslauf

Einleitung

Die Leber spielt eine zentrale Rolle im Stoffwechselgeschehen. Viele Leistungen führt sie für den gesamten Organismus aus, einige davon sind organtypisch, wie z.B. die Synthese von Serumproteinen oder von Harnstoff. Um die Physiologie dieses Organs in vitro zu studieren, wurden verschiedene Modelle entwickelt:

1.) die isoliert perfundierte Leber
2.) Suspensionen von Lebereinzelzellen
3.) Leberzellinien
4.) Primärkulturen von Hepatozyten

Ein weit verbreitetes in vitro-Modell ist die isoliert perfundierte Leber (Hems et al.,1966). In diesem Versuchsmodell laufen viele Stoffwechselwege in den ersten Stunden mit der gleichen Geschwindigkeit ab wie in der Leber des intakten Tieres (Staib& Scholz, 1968). Daher konnte man die isoliert perfundierte Leber zum Vergleich heranziehen, wenn die Funktionsfähigkeit eines neuen Modells zur Untersuchung des Leberstoffwechsels überprüft werden sollte. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß die Stoffwechselaktivität eines heterogenen Gewebes gemessen wird, d.h. bestimmte Syntheseleistungen werden auch von Nichtparenchymzellen erbracht, wie z.B. die Harnstoffbildung durch Kupffersche Sternzellen (Wagle et al.,1976).

Den Vorteil einer homogenen Hepatozytenpopulation bietet dagegen das Modell der Lebereinzelzellsuspension. Eine solche Lebereinzelzellsuspension

läßt sich nach Kollagenasebehandlung gewinnen (Berry& Friend,1969).Wie am Modell der isoliert perfundierten Leber lassen sich viele Stoffwechselleistungen nachweisen.Die Lebensfähigkeit beider Systeme ist jedoch auf wenige Stunden begrenzt und regulatorische Mechanismen,die eine tagelange Einwirkung des Stimulus voraussetzen,lassen sich aus diesem Grund nicht studieren.

Leberzellinien stellen ein langlebiges in vitro-System dar.Aber viele etablierte Zellinien unterscheiden sich von der erwachsenen Leberzelle, z.B. in der Chromosomenzahl (Gerschenson et al., 1972) oder im Isozymmuster.So wurde beschrieben, daß Isozymmuster bestimmter Zellinien dem foetalen Zustand ähneln (Walker et al.,1972) oder für andere Organe typisch sind (Ogawa et al.,1970).Darüber hinaus wurde beobachtet,daß die Empfindlichkeit von RLC-Zellen gegenüber Insulin nach mehreren Zellgenerationen verloren ging (Walker et al.,1972).

Alle Nachteile,die den bisher geschilderten Modellen anhaften,konnten durch die Entwicklung der Primärkultur von Hepatozyten überwunden werden. Sie basiert auf der Fähigkeit des Hepatozyten,sich an eine Plastikunterlage anzuheften und nach 24 Stunden ein einschichtiges Epithel zu bilden.

So ist es Bissell 1973 zum ersten Mal gelungen,Hepatozyten erwachsener Ratten mehrere Tage in Kultur zu halten (Bissell et al.,1973).Viele leberspezifische Funktionen bleiben erhalten,wie z. B.

Albuminsynthese und Gluconeogenese (Bissell et al., 1973).

Alle Bestrebungen gingen von nun an dahin, die Überlebensfähigkeit des Hepatozyten unter Wahrung seiner Stoffwechselleistungen in Kultur zu verlängern. Einen wichtigen Beitrag dazu lieferten Michalopoulos und Pitot,die Zellkulturen auf Kollagengelen anlegten (Michalopoulos& Pitot,1975).

Spezifische Faktoren,welche die Anpassung des Hepatozyten an die Bedingungen der Primärkultur fördern,sind bisher nur wenig untersucht worden. Viele Laboratorien haben Insulin zum Kulturmedium gegeben (Bissell et al.,1973;Bonney et al.,1974; Bernaert et al.,1977).Es wurde beobachtet,daß die subzellulären Strukturen unter Insulineinfluß besser erhalten bleiben (Wagle et al.,1973) und die Anheftungsfähigkeit in den ersten Stunden erhöht wird (Laishes& Williams,1976).

Durch Zusatz weiterer Hormone war es möglich,den Abfall leberspezifischer Enzyme im Verlauf einer mehrtägigen Kultur zu verhindern (Decad et al.,1977),ja sogar eine Desoxyribonukleinsäuresynthese auszulösen (Leffert,1974).

Nachdem gezeigt worden war,daß der Hepatozyt in unserem Kulturmedium morphologisch der Leberzelle in vivo gleicht und er zu organtypischen Leistungen,wie Harnstoff- und Ketonkörpersynthese befähigt ist (Barth et al.,1977),sollte ein

weiterer Stoffwechselweg auf seine Funktionsfähigkeit in Kultur überprüft werden: aus mehreren Substraten sollten Gluconeogeneseraten zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur gemessen werden. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob die Glucosebildung durch Hormonzusatz beeinflußt oder sogar über längere Zeit erhalten werden kann.

Ferner sollten erste Versuche zur Regulation des Lipidstoffwechsels in unserem Kultursystem durchgeführt werden. Viele Untersuchungen haben gezeigt, daß die HMG-CoA Reduktase das Schlüsselenzym der hepatischen Cholesterolsynthese darstellt (Übersicht bei Dempsey, 1974). Die Aktivität der HMG-CoA Reduktase wird vom Cholesterolgehalt der Nahrung (Siperstein& Fagan, 1966), durch Hormone (Dugan et al., 1974) und Lipoproteine (Breslow et al., 1977) beeinflußt. Alle diese Faktoren wirken in vivo zusammen und bestimmen die Aktivität des Enzyms.

Aus diesem Grund erschien es sinnvoll, die hormonelle Regulation der HMG-CoA Reduktase-Aktivität unter stabilen und genau definierten Bedingungen in einer Primärkultur zu studieren.

Abkürzungen

ALA	L-Alanin
c AMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
C-Einheiten	Kohlenstoffeinheiten
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DHA	Dihydroxyaceton
DTE	1,4 Dithioerythrit
EDTA	Äthylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz (Dihydrat)
EGTA	(Bis-(aminoäthyl)- glycoläther- N,N,N',N'-tetraessigsäure,3,6- Dioxaoctamethylendinitrilotetra- essigsäure
FCS	Fötales Kälberserum
FBP ase	Fructose-1,6- Bisphosphatase
FRC	Fructose
c GMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
G-6-P ase	Glucose-6-Phosphatase
GLM	Glutamin
HK	Hepatozytenkultur
p-HBA	para-Hydroxybenzaldehyd
HMG-CoA	ß- Hydroxy- ß- methyl- glutaryl-Coenzym
Reduktase	A Reduktase
Hepes	N'-2'- Hydroxyäthylpiperazin-2- äthan-sulfonsäure
HMG-säure	Hydroxymethylglutarsäure

Fortsetzung Abkürzungen:

HMG-CoA	ß-Hydroxy-ß-methylglutaryl-Coenzym A
I^{++}	modifiziertes Leibovitz Medium mit Insulin (625 mU/ml)
$I_{1:100}$	modifiziertes Leibovitz Medium mit Insulin (6,25 mU/ml)
LAC,Lactat	L-Milchsäure,Natriumsalz
MVL	Mevalonolacton
NADP	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat,oxydiert
PGE_1	Prostaglandin E_1
PGE_2	Prostaglandin E_2
PYR,Pyruvat	Brenztraubensäure,Natriumsalz
PC	Pyruvatcarboxylase
PEP-CK	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
STH	Somatotropin,Wachstumshormon
TCA	Trichloressigsäure
TAT, Tyrosin-transaminase	Tyrosin-α- Ketoglutarat-Transaminase
T_3	3,3',5- Triiodothyronin
VLDL	" very-low-density" Lipoproteine

Fettsäuren:

Zahl der C-Atome		Anzahl der Doppelbindungen und sterische Anordnung		Trivialname der Fettsäure
18	:	1	cis	Ölsäure
18	:	1	trans	Elaidinsäure
16	:	0		Palmitinsäure
18	:	0		Stearinsäure
18	:	2	cis	Linolsäure
18	:	3	cis	Linolensäure
20	:	4	cis	Arachidonsäure

E.C.- Nummern verwendeter Enzyme:

Amyloglucosidase	E.C. 3.2.1.3.
Fructose-1,6-Bisphosphatase	E.C. 3.1.3.11
Glucose-6-Phosphatase	E.C. 3.1.3.9
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	E.C. 1.1.1.49
Hexokinase	E.C. 2.7.1.1
HMG-CoA Reduktase	E.C. 1.1.1.34
Phosphoenolpyruvat-carboxykinase	E.C. 4.1.1.32
Pyruvatcarboxylase	E.C. 6.4.1.1
Tyrosintransaminase	E.C. 2.6.1.5

I.) Methoden

1.) Zellkultur

a.) Sterile Perfusion

Lebereinzelzellen wurden nach einer Modifikation der von Berry und Friend angegebenen Methode präpariert (Berry & Friend,1969).

b.) Anlegen der Zellkultur

Die Aussaat der Hepatozyten erfolgte auf Plastik (Falcon Plastik No. 3002, ⌀ 60mm) oder auf Kollagengele in I^{++} mit 10 % FCS (siehe Medien für die Zellkultur).Jede Falconschale erhielt 2,5 ml einer Zellsuspension mit einer Zelldichte von 1 x 10^6 Zellen/ml. Die Zellzahl wurde in einer Fuchs-Rosenthalkammer bestimmt,die Vitalität der Hepatozyten mit Hilfe der Trypanblaufärbung beurteilt.

c.) Herstellen der Kollagengele

saure Kollagenlösung:

1,5 g Rattenschwanzsehnen wurden auf 2 sterile Falconschalen verteilt und 24 Stunden mit UV bestrahlt (λ= 254 nm).Die trockenen Sehnen wurden bei 4°C in 300 ml steriler 0,1% Essigsäure gerührt.Nach 2 Tagen hatte sich das unlösliche Kollagen abgesetzt und der lösliche Anteil konnte dekantiert werden.

alkalische Hepeslösung :

10 ml L-15 Medium wurden mit 1,25 ml 2 M wässriger Hepeslösung,133,3 mg Albumin und 0,5 ml 5 N NaoH versetzt.

Gießen der Kollagengele:

1,7 ml essigsaure,raumtemperierte Kollagenlösung wurde mit 1 ml alkalischer Hepeslösung in einer Falconschale neutralisiert.Das Gel wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur zur Gelbildung stehen gelassen.
Anschließend wurde das Gel zweimal mit I^{++}(siehe Medien für die Zellkultur) gewaschen,dann nochmals mit I^{++} mit 10 % FCS (siehe Medien für die Zellkultur).

d.) Perfusionsmedien (jeweils pH 7,4)

I a : 0,5 mM EGTA,Ca^{++}-freie Bicarbonat-Krebs-Ringer Lösung plus 5,5 mM Glucose
I b : Ca^{++}-freie Bicarbonat-Krebs-Ringer Lösung plus 5,5 mM Glucose
II : Ca^{++}-freie Bicarbonat-Krebs-Ringer Lösung,30 mg/60 ml Collagenase II,4,6 mM Glucose,2,1 % Albumin "reinst" (Fa. Behring),Aminosäuren 40 mg/60 ml
III : Ca^{++}-freie Bicarbonat-Krebs-Ringer Lösung,2,1 % Albumin "reinst " (Fa. Behring),3,3 mM $CaCl_2 \times 2\ H_2O$
Die Medien wurden 30 Minuten bei 37°C mit Carbogen(5% CO_2in 95% O_2)begast.

e.) Medium für Stoffwechselexperimente : III-A

Ca^{++}-freie Bicarbonat-Krebs-Ringer Lösung,2,1 % Albumin "reinst" (Fa. Behring) kohlebehandelt,3,3 mM CaCl x 2 H_2O 2 mM Octansäure

f.) Waschmedien

Medium für Waschtechnik I :
0,9 % NaCl
Medium für Waschtechnik II :
Ca^{++}-freie Bicarbonat-Krebs-Ringer Lösung, 3,3 mM $CaCl_2$ x 2 H_2O .
Zusammensetzung der Ca^{++}-freien Bicarbonat-Krebs-Ringer Lösung:
0,692 % NaCl, 0,0162 % KH_2PO_4, 0,0294 % $MgSO_4$ x 7 H_2O, 0,0354 % KCl, 25 mM $NaHCO_3$

g.) Medien für die Zellkultur (jeweils pH 7,4)

I^{++}: Leibovitz L-15 Medium mit folgenden Zusätzen: 100 U /ml Penicillin,100 µg/ml Streptomycin, 8,3 mM Glucose, 5 mM L-Lactat, 0,5 mM Oleat, 0,4 % Albumin " reinst" (Fa. Behring),27 mM $NaHCO_3$, 625 mU/ml Insulin Novo (= 25 µg/ml).

$I_{1:100}$: wie I^{++}, aber 6,25 mU/ml Insulin Novo (=0,25 µg /ml).

I^{++} mit 10 % FCS : wie I^{++}, aber in 1 Liter I^{++} 100 ml FCS

mA : wie I^{++}, ohne 0,4 % Albumin und ohne 0,5 mM Oleat

Die Medien wurden 20 Minuten bei 37°C mit 5% CO_2 in Luft begast.

2.) DNS-Bestimmung

Die Bestimmung der DNS wurde nach der im Labor üblichen Methode durchgeführt (Barth & Willershausen,1978).

3.) Proteinbestimmung nach Lowry

Lösungen

0,1 N NaOH,Folin Ciocalteus Phenol Reagenz,3 M TCA (Trichloressigsäure)

Lösung A: 10 % Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH

Lösung B: 0,0122 % $CuSO_4$ x 5 H_2O in 0,0244 % Na-K-tartrat

Lösung C: 41 ml Lösung B und 10 ml Lösung A

Bestimmung

10 mg Rinderserumalbumin "reinst" (Fa.Behring) wurden in 10 ml 0,1 N NaOH gelöst.Von dieser Albuminlösung wurden zur Erstellung einer Eichkurve zwischen 0 und 100 µg Protein eingesetzt,von den zu testenden Proben 50 µl und 100 µl.Anschließend wurde mit dem gleichen Volumen 3 M TCA gefällt,am Whirlimix gemischt und das gefällte Protein 4 Minuten in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen.Die Niederschläge wurden in jeweils 200 µl 0,1 N NaOH aufgenommen. Um das gefällte Protein wieder zu lösen,mußte kräftig auf dem Whirlimix geschüttelt werden.Alle Proben wurden mit 500 µl frisch bereiteter Lösung C gestartet,nach exakt 10 Minuten 50 µl Folinreagenz zugesetzt.Nach 30

Minuten wurde am Gilford Spectrophotometer bei der Wellenlänge 750 nm (Glasküvette) abgelesen.

4.) Bestimmung der Glucose-6-Phosphatase-Aktivität

Die Aktivität der Glucose-6-Phosphatase wurde nach einer Methode von Baginski,Foa und Zak bestimmt (Baginski et al.,1974).

Mikrosomenpräparation

Es wurde bei jeweils 5 Schalen das Medium abgesaugt und nach Ernte der Zellen mit Hilfe eines Gummischabers ("rubber policeman ") mit 5 ml 0,25 M Saccharose nach Dounce homogenisiert (10 x,Braun Typ S Homogenisator,4°C). Das Homogenat wurde 30 Minuten in der Kühlzentrifuge bei 30 000 g zentrifugiert,der Niederschlag verworfen,der daraus resultierende Überstand 1 Stunde in der Ultrazentrifuge bei 105 000 g (4°C) zentrifugiert. Der Mikrosomenniederschlag wurde in 0,5 ml 0,25 M/1mM Saccharose/EDTA aufgenommen,erneut mit einem Dounce-homogenisator resuspendiert,in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und bis zum Tag der Bestimmung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

5.) Bestimmung der Tyrosintransaminase-Aktivität

Die Bestimmung wurde nach der Methode von Diamondstone durchgeführt (Diamondstone,1966).
Zur Bestimmung war der Inhalt von 5 Schalen ausreichend.Es wurde der 105 000 g-Überstand,der bei der Mikrosomenpräparation gewonnen wurde (siehe Experimenteller Teil, I,4) eingesetzt.

6.) Glykogenbestimmung

Zu Beginn dieser Arbeiten wurde festgestellt,daß die Reagenzienleerwerte zu hoch waren,um eine empfindliche Glykogenbestimmung zu gewährleisten.Es stellte sich dann heraus,daß verschiedene kommerzielle Amyloglucosidasepräparationen eine störende enzymatische Verunreinigung enthielten,worauf im Folgenden näher eingegangen wird.
Als Grundlage für die Erarbeitung einer Glykogenbestimmungsmethode diente die Arbeit von Chan und Exton (Chan & Exton,1976).
Prinzip:
Hepatozytenhomogenat wurde auf Filterpapier aufgetragen.Freie Glucose,die sich im Homogenat befindet, wurde durch Waschen des Filterpapiers entfernt. Glykogen blieb am Filterpapier haften und wurde mittels Amyloglucosidase enzymatisch in Glucose gespalten.

Methodische Voruntersuchungen

a.) Einsatz verschiedener Amyloglucosidasen:

Mit verschiedenen Amyloglucosidasen wurden unterschiedliche Mengen von Glucose aus Filterpapier freigesetzt (Tabelle 1).Die Amyloglucosidase der Fa. Merck hatte die höchste,das Enzym der Fa. Sigma die geringste glucosefreisetzende Aktivität (siehe Tabelle 1).

Wir deuten diese Glucosefreisetzung als Folge einer Verunreinigung des käuflichen Enzyms mit Cellulasen. Zur Glykogenbestimmung wurde daher zur Erreichung geringer Blindwerte das letztgenannte Enzym verwendet.

b.) Glucosefreisetzung durch Amyloglucosidase aus ungewaschenem und gewaschenem Filterpapier nach unterschiedlich langer Inkubationszeit:

Bei Vergleich von ungewaschenem und gewaschenem Filterpapier ergab sich kein Unterschied in der Glucosefreisetzung durch Amyloglucosidase (Fa. Merck).

Bei 30-,60-,90- und 120- minütiger Inkubationsdauer wurde bei gleichbleibender Enzymkonzentration (100 µg/ml) vermehrt Glucose aus Filterpapier freigesetzt (Tabelle 2).

Daraus kann man schlußfolgern,daß das benutzte Filterpapier keine Verunreinigungen enthielt,die zu den anfänglich beobachteten Reagenzienleerwerten beitrugen.

Tabelle 1

Glucosefreisetzung aus Filterpapier durch verschiedene Amyloglucosidasen

	Aktivität der Amyloglucosidase (nmol freigesetzte Glucose)			
Amyloglucosidase-konzentration (µg/ml):	50	100	200	300
Herkunft der Amyloglucosidase				
Aspergillus niger (Fa. Boehringer):	50	91	166	-
Aspergillus niger (Fa. Merck) :	83	120	208	307
Aspergillus oryzae (Fa. Sigma) :	25	29	33	46

Je 3 Filterpapierstreifen (Whatman 3 M,6 x 2,5 cm,längs halbiert) wurden bei 39° C in 0,14 M Acetatpuffer pH 4,8 mit steigenden Amyloglucosidasekonzentrationen 90 Minuten unter Schütteln inkubiert.Nach der Inkubation wurden die Filterpapiere aus dem Inkubat entfernt und das Inkubat am Rotationsverdampfer bei 70° C bis zur Trockene eingeengt .Schließlich wurde in 1 ml aqua dest. aufgenommen und die Glucosebestimmung durchgeführt.

Tabelle 2

Glucosefreisetzung durch Amyloglucosidase aus ungewaschenem und gewaschenem Filterpapier mit steigender Inkubationszeit

	Aktivität der Amyloglucosidase (nmol freigesetzte Glucose)			
Inkubationsdauer (min):	30	60	90	120
ungewaschenes Filterpapier :	50	75	100	137
gewaschenes Filterpapier :	58	75	108	125

Je 3 Filterpapierstreifen (Whatman 3 M,6,5 x 2,5 cm,längs halbiert) wurden bei 39° C in 0,14 M Acetatpuffer pH 4,8 30,60,90 und 120 Minuten bei konstanter Amyloglucosidasekonzentration (100 µg/ml, Fa.Merck) inkubiert.Es wurde gewaschenes und ungewaschenes Filterpapier verwendet. Whatman 3 M Filterpapier wurde durch Rühren in aqua dest. bei 70°C gewaschen.Nach der Inkubation wurden die Filterpapiere aus dem Inkubat entfernt und das Inkubat am Rotationsverdampfer bei 70°C bis zur Trockene eingeengt. Schließlich wurde in 1 ml aqua dest. aufgenommen und die Glucosebestimmung durchgeführt.

Glykogenbestimmung

Lösungen:

1 N HCl,0,9 % NaCl,66 % Äthanol,Aceton p.A.,0,2 M Acetatpuffer pH 4,8,1 mg/ ml Amyloglucosidaselösung (Grad V Sigma) in 3,2 M Ammoniumsulfat

Bestimmung:

Fünf Falconschalen mit angeheftetem Hepatozytenmonolayer auf Kollagengel wurden mit Waschtechnik I behandelt (siehe Experimenteller Teil I ,11).Dann wurde der gesamte Inhalt vom Plastik gelöst,in 2 ml 0,9 % NaCl aufgenommen und unter Zusatz von 50 µl 1 N HCl mit dem Ultraturrax 15 Sekunden bei 4° C homogenisiert.Das Homogenat wurde auf Filterpapier aufgetragen (3 Filterpapierstreifen,Whatman 3 M,6 x 2,5 cm). 3 Filterpapierstreifen wurden bei der Bestimmung als Leerwert mitgeführt.Nach dem Auftragen wurde 10 Minuten im Trockenschrank bei 70°C getrocknet.Die getrockneten Filterpapierstreifen wurden 90 Minuten in 66 % Äthanol unter Rühren gewaschen.Der Magnetrührer wurde durch ein Metallnetz von den Filterpapierstreifen getrennt.Dann wurde kurz mit Aceton gespült und wieder bei 70°C im Trockenschrank für 10 Minuten getrocknet.
Die Filterpapierstreifen wurden längs halbiert und in Zentrifugenplastikröhrchen,die mit 0,14 M Acetatpuffer pH 4,8 und einer Amyloglucosidaseendkonzentration von 100 µg/ml vorbereitet waren,gegeben.Die verschlossenen

Röhrchen wurden 90 Minuten bei 39°C unter Schütteln inkubiert.
Nach der Inkubation wurden die Filterpapiere aus dem Inkubat entfernt und das Inkubat am Rotationsverdampfer bei 70°C bis zur Trockene eingeengt. Schließlich wurde in 1ml aqua dest. aufgenommen und die Glucosebestimmung durchgeführt.

7.) Glucosebestimmung

Die Glucosebestimmung mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase wurde nach Bergmeyer durchgeführt (Bergmeyer et al.,1974).

8.) Bestimmung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität

Zur Bestimmung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität in Fibroblasten werden die Zellen mit dem nichtionischen Detergens Kyro-EOB aufgeschlossen (Brown,Dana & Goldstein,1974). Vorversuche mit dieser bequemen Extraktionsmethode ergaben, daß an sich auch im Falle von Hepatozyten gut messbare Aktivitäten der HMG-CoA Reduktase extrahiert werden. Bei Kontrolluntersuchungen stellte sich dann aber heraus, daß das Detergens auch die störende HMG-CoA Lyase extrahiert. Dieses Enzym spaltet das Substrat der HMG-CoA Reduktase während des Tests und droht die Substratkonzentration auf suboptimale Werte herabzudrücken. Aus diesem Grunde

mußte auf die umständlichere Mikrosomenpräparation nach mechanischem Aufschluß und Differentialzentrifugation zurückgegriffen werden.
Als Grundlage diente die Methode von Berndt,die zur Bestimmung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität in der Hepatozytenkultur,wie im Folgenden beschrieben, modifiziert wurde (Berndt & Gaumert,1971).

Prinzip

Die Aktivität der mikrosomalen HMG-CoA Reduktase wurde durch die Entstehung der 14-C-markierten Mevalonsäure aus dem 14-C-markiertem Substrat gemessen.Durch Ansäuern wurde das Substrat in freie HMG-säure und Coenzym A gespalten und die Mevalonsäure in ihr Lacton überführt.Die laktonisierte Mevalonsäure wurde durch Dünnschichtchromatographie von der radioaktiven HMG-säure getrennt.Die Radioaktivität des mittels UV-Licht sichtbar gemachten Mevalonolactons wurde im Packard Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt.

Lösungen:

4 M Kaliumphosphatpuffer / 0,4 M Na-EDTA pH 7,2
2 M Glucose-6-phosphat, 0,4 M NADP oxydiert,
40 mg/ml Albumin "reinst" (Fa. Behring),
0,96 M DTE, 4 mg/ml Glucose-6-phosphat Dehydrogenase
aus Leuconostoc mesenteroides (550 U /mg),
1 M Mevalonolacton, 0,1 M HMG-säure, radioaktiv
markiertes HMG-CoA (50-52 µCi x μMol^{-1}), Bray-
Szintillationslösung, Homogenisationsmedium
(0,1 M Saccharose, 50 mM KCl, 40 mM KH_2PO_4,
30 mM di Na-EDTA) pH 7,2

Bestimmung:

5 bis 10 Schalen wurden mit Waschtechnik III
(siehe Experimenteller Teil I,11) behandelt,
die Zellen mit einem rubber policeman abge-
schabt und in Homogenisationsmedium pH 7,2
aufgenommen.
Die Zellen wurden entweder durch Homogenisation
nach Dounce (10x, Braun Typ S Homogenisator, 4°C)
oder durch Behandlung mit dem Ultraturrax (15
Sekunden, 4°C) aufgeschlossen.

Das Homogenat wurde 30 Minuten in der Kühlzentrifuge bei 30 000 g zentrifugiert,der Niederschlag verworfen, der daraus resultierende Überstand 1 Stunde in der Ultrazentrifuge bei 105 000 g (4°C) zentrifugiert. Der Mikrosomenniederschlag wurde in 0,5 ml Homogenisationsmedium aufgenommen und erneut nach Dounce resuspendiert.Ein Teil wurde für die Proteinbestimmung nach Lowry eingesetzt,ein anderer Teil für die Messung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität.

Durchführung der Bestimmung :

Ein Testansatz enthielt Mikrosomensuspension in Homogenisationsmedium mit folgenden Komponenten (Endkonzentrationen im Test sind in Klammern angegeben) :
Kaliumphosphat/EDTA Puffer pH 7,2 (0,4 M, 40 mM), Glucose-6-phosphat (40mM), NADP oxydiert (4 mM), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (5,5 U), DTE (9,6 mM), Serumalbumin (0,4 mg/ml), 14-C- markiertes HMG-CoA ($0,8 \times 10^{-5}$ M).
Ein Leerwert,bestehend aus Homogenisationsmedium und den genannten Komponenten wurde bei jeder Bestimmung mitgeführt.
Dieser Testansatz wurde im Wasserbad bei 37° C 20 Minuten inkubiert.15 Sekunden vor Ende wurden kaltes Mevalonolacton (167 mM) und kalte HMG-säure (7 mM) als Trägersubstanzen für die nachfolgende Chromatographie zugefügt. Die Reaktion wurde nach 20 Minuten mit 12 N H_2SO_4

gestoppt. Testansätze und Leerwert wurden anschließend zur Überführung der Mevalonsäure ins Mevalonsäurelakton 10 Minuten bei 50°C inkubiert. Dann wurden die Ansätze 15 bis 30 Minuten auf Eis gehalten und das ausgefällte Protein in der Eppendorf Tischzentrifuge abzentrifugiert. 150 µl des Überstands wurden abgehoben und strichförmig (3 cm) auf Kieselgelplatten (Kieselgel $HF_{254 +366 nm}$, Typ 60) aufgetragen. Die Chromatographie erfolgte im Laufmittel Benzol:Aceton=1:1. Das Mevalonolacton (Fluoreszenz bei 254 nm) wurde unter der UV-Lampe lokalisiert, der Kieselgelfleck ausgekratzt und mit 10 ml Bray Szintillationsflüssigkeit im Packard Flüssigkeitsszintillationszähler gezählt.

Berechnung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität:

Die Aktivität wurde in pmol Mevalonolacton x min^{-1} x mg mikrosomales $Protein^{-1}$ berechnet und basiert auf folgender Formel:

$$\frac{{}^{1}dpm \times {}^{2}0{,}5 \times {}^{3}0{,}46}{{}^{4}0{,}15 \times {}^{5}0{,}1 \text{ bzw.} 0{,}2 \times {}^{6}20 \times {}^{7}1{,}11 \times 10^{2}}$$

[1]dpm: berechnet aus cpm unter Berücksichtigung des Leerwerts und der Zählausbeute, die sich durch die Scintillationslösung und das Kieselgel ergibt

[2]0,5: Gesamtvolumen der Mikrosomensuspension in ml

[3]0,46: Gesamtvolumen des Testansatzes nach Beendigung des Tests in ml

[4]0,15: die auf das Kieselgel aufgetragene Menge des Testansatzes nach Ende des Tests in ml

[5] 0,1 bzw. 0,2 : beträgt das Volumen in ml der eingesetzten Mikrosomensuspension

[6] 20 : Inkubationszeit in Minuten

[7] $1{,}11 \times 10^2$: spezifische Aktivität des Substrats: $1{,}11 \times 10^5$ dpm / nmol. Im Faktor $1{,}11 \times 10^2$ ist bereits berücksichtigt, daß die Aktivität in pmol MVL x min^{-1} x mg mikrosomales $Protein^{-1}$ angegeben wird.

9.) Fettsäure-Albuminkomplexe

wurden nach der Methode von Harken, Dixon und Heimberg hergestellt (Harken et al., 1969).

Reinigung des Albumins
Albumin "reinst" (Fa. Behring) wurde über Aktivkohle nach der Methode von Chen gereinigt (Chen, 1967).

10.) Hormone: Lösungsmittel und Konzentrationen

Hormon	Stammlösungsmittel	Endkonzentration in Kultur (M)
Acetylcholin	aqua dest.	10^{-6}, 10^{-4}
ACTH vom Schwein	aqua dest.	$9{,}4 \times 10^{-7}$
Adrenalin	als pharmazeutische Zubereitung : Suprarenin Lösung 1:1000, Hoechst	10^{-9}, 10^{-6}, 10^{-5}

Dexamethason	als pharmazeutische Zubereitung: Fortecortin 4 mg/ml Merck Monoampulle	10^{-6}, 10^{-5}
17 ß-Estradiol	Propylenglykol	10^{-6}, 10^{-5}
Gastrin	aqua dest.	10^{-5}
Glucagon	0,01 N NaOH	10^{-11}, 10^{-9}, 10^{-7}
Insulin	0,01 N HCl	$0,5 \times 10^{-7}$, $0,5 \times 10^{-5}$
Noradrenalin	0,9 % NaCl	10^{-9}, 10^{-5}
Progesteron	Propylenglykol	10^{-5}
Prostaglandine E_1 und E_2	Propylenglykol	$5,6 \times 10^{-9}$ $5,6 \times 10^{-7}$
Sekretin	0,01 N NaOH	10^{-5}
Somatotropin	0,003 N NaOH	10 µg/ml
Testosteron	Propylenglykol	10^{-5}
T_3	0,1 M Glycin, 0,1 N NaOH	$1,54 \times 10^{-7}$ $1,54 \times 10^{-6}$ $7,68 \times 10^{-6}$ 10^{-6}

Den wässrigen Stammlösungen von Peptidhormonen wurde Bacitracin in einer Konzentration von 1 mg / ml zur Hemmung des proteolytischen Abbaus durch die Hepatozyten zugesetzt (Desbuquois et al.,1974).

11.) Methoden zur Entfernung nicht angehefteter Zellen aus Primärkulturen von Hepatozyten

Waschtechnik I:

Die Falconschale mit dem angehefteten Hepatozytenmonolayer wurde mit 2,5 ml 0,9 % NaCl überschichtet, dann wurde abgesaugt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt.

Waschtechnik II:

Waschtechnik II ließ sich nur bei Hepatozytenmonolayer auf Kollagengel anwenden. Das Kollagengel wurde von der Plastikunterlage gelöst, das Medium abgesaugt und das Gel 10 Minuten bei 37°C in 100 ml Krebs-Ringer-Bicarbonat geschüttelt (Schüttelfrequenz: 50 Hz).

Waschtechnik III:

Die Falconschale mit dem angehefteten Hepatozytenmonolayer wurde in ca. 200 ml Homogenisationsmedium (siehe Experimenteller Teil I,8) mehrmals geschwenkt.

II.) Material

1.) Geräte :

Flüssigkeits-Szintillations-Zähler (Typ 3390),Fa. Packard.

CO_2 - Inkubator (Typ 329), Fa. Forma.

pH- Meter (Typ 26),Fa. Hillerkus.

Phasenkontrast-Mikroskop mit Photoautomatik,

Fa. Leitz, Fa. Wild.

Registrierendes Photometer (Typ 1101 M) mit Küvettenwechselautomat (Typ 2705), Fa. Eppendorf.

Registrierendes Spektralphotometer (Typ 240), Fa. Gilford.

Rotationsverdampfer (Typ 5111),Fa. Heidolph.

Ultra- Turrax (Typ 18 - 10),Fa. Jahnke & Kunkel.

Ultraschallgerät (Typ B - 12),Fa. Branson.

Waagen (Typ P 163, Typ H 31), Fa. Mettler.

Zentrifuge (Typ L5 - 50), Fa. Beckman.

Zentrifuge (Typ 3200), Fa. Eppendorf.

Zentrifuge (Typ RC-2-B) Sorvall , Fa. Hormuth-Vetter.

2.) Versuchstiere und Futter:

♂Sprague-Dawley Ratten (SPF),Fa. Voss

Gewicht: 140 - 150 g

Beleuchtung im Stall : Licht von 6^{00}- 18^{00}, Altromin-R-10

Standard-Diät und Wasser ad libitum

3.) Zellkultur- und Medienkomponenten :

Fötales Kälberserum (hitze-inaktiviert), Fa. Gibco Kat.Nr. 629

Leibovitz L-15 Medium, Fa. Gibco, Kat.Nr. 430-1300

4.) Chemikalien,nach Herstellern geordnet, Kat.Nr. in Klammern :

a.) Boehringer

Glucose-6-phosphat Dinatriumsalz (127647)

α- Ketoglutarat Dinatriumsalz(127205)

b.) Merck

Ammoniumheptamolybdat (1182)

Brenztraubensäure Natriumsalz (6619)

D-Fructose (5323)

Folin Ciocalteus Phenol Reagenz (9001)

D-Glucose (8342)

L-Glutamin (289)

Kieselgel $HF_{254 + 366}$ (7741)

Natriummetaarsenit (6287)

Octansäure (193)

L-Tyrosin (8371)

Titriplex III (8418)

Tris-Natriumcitrat-2-hydrat (6448)

c.) NEN

NEC-642 Coenzyme A, DL - 3 (Glutaryl-3-^{14}C)- hydroxy-3-methylglutaryl, 50 - 52 mCi/mmol

d.) Packard

2,5 Diphenyloxazol (6002025)

1,4 - bis- (2-(5-Phenyloxolyl)) Benzene (6002032)

e.) Roth

3,5 Diaminobenzoesäure (4943)

Dihydroxyaceton (6963)

L-Milchsäure Natriumsalz (8466)

f.) Serva

L-Alanin (11470)

Diäthyldithiocarbamat, Natriumsalz (18811)

N-2'- Hydroxyäthylpiperazin-2-äthan-sulfonsäure

Oleic acid (31069)

g.) Sigma

Arachidonic acid (A 6382)

Deoxyribonucleic acid (D 1501)

Elaidic acid (E 1000)

ß-Hydroxy-ß-methyl-glutaric acid (1752)

Linoleic acid (1376)

Linolenic acid (2378)

Palmitic acid (0500)

Stearic acid (4751)

5.) Enzyme und Coenzyme, nach Herstellern geordnet :

a.) Boehringer

Enzyme :

Amyloglucosidase (102849)

Hexokinase aus Hefe (127817)

Glucose-6-phosphat Dehydrogenase aus Hefe (127655)

Glucose-6-phosphat Dehydrogenase aus Leuconostoc mesenteroides (165883)

Coenzyme:

Adenosin-5'-triphosphat (127531)

NADP Dinatriumsalz (128040)

b.) Merck

Enzyme:

Proteinase K (24568)

Amyloglucosidase (1330) 50 U / mg

Coenzyme:

Pyridoxal-5'-phosphorsäureester (7526)

c.) Sigma

Enzyme :

Amyloglucosidase aus Aspergillus oryzae (9268)

d.) Worthington

Enzyme :

Kollagenase (CLS II 45 M 175)

6.) Hormone und Peptide, nach Herstellern geordnet:

a.) Hoechst

Suprarenin Lösung 1:1000

b.) Merck

Fortecortin

c.) Novo

Insulin (porcine, mono-component)

d.) Paesel

Somatotropin vom Schwein (13-605-6741)

e.) Pierce

Tissue culture serum factor (28700)

f.) Serva

ACTH vom Schwein (10690)

Progesteron (33530)

Prostaglandin E_1 (33732)

Prostaglandin E_2 (33733)

g.) Sigma

Acetylcholinchlorid (6625)

Bacitracin (0125)

Colchicine (9754)

ß- Estradiol (8875)

L-Epinephrinbitartrat (4375)

Gastrin (5880)

Glucagon (4250)

Sekretin (3250)

3,3',5- Trijodthyronin (2877)

Testosteron (1500)

A Gluconeogenese in Primärkulturen von Hepatozyten

Vorbemerkungen

Früher war bereits gezeigt worden,daß der Hepatozyt in Kultur hinsichtlich zweier organtypischer Leistungen, nämlich der Ketonkörperproduktion und der Harnstoffsynthese der Leberzelle in vivo gleicht (Barth et al.,1977).

Gegenstand der folgenden Untersuchungen sollte ein anderer organtypischer Stoffwechselweg,nämlich die Gluconeogenese sein.

Die Gluconeogeneseraten der Hepatozyten in Kultur sollten dann mit Werten,die von früheren Untersuchern unter in vivo-Bedingungen erhalten worden waren,verglichen werden.

Die Abbildung 1 skizziert die Reaktionen,über die verschiedene Substrate in die Gluconeogenese einmünden. Fructose und Dihydroxyaceton passieren dabei zwei, Glutamin drei,Alanin,Lactat und Pyruvat vier gluconeogenetische Schlüsselenzyme.

Werden Gluconeogeneseraten aus verschiedenen Substraten gemessen,muß berücksichtigt werden,daß die gebildete Glucose nicht ausschließlich einer Gluconeogeneseleistung entstammen muß,sondern auch auf dem Weg der Glykogenolyse entstehen kann.Deshalb muß die Änderung des Glykogengehalts der Leberzelle während des Gluconeogeneseexperiments erfaßt werden.

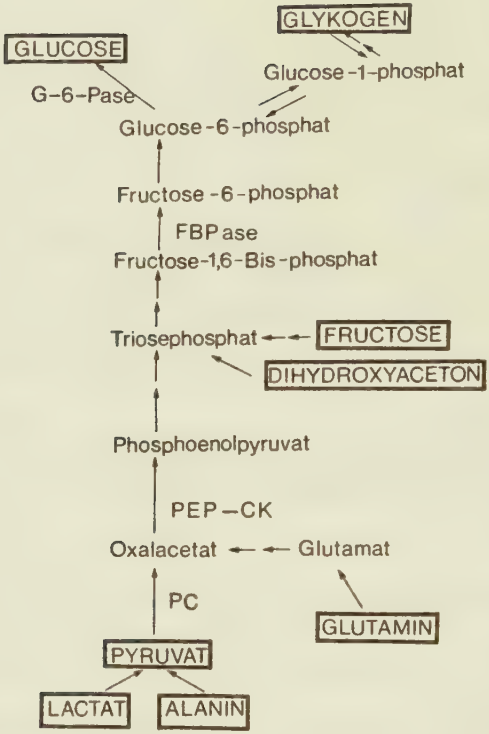

Abb.1: Einmündung verschiedener Substrate in den Stoffwechselweg der Gluconeogenese. Umrandungen markieren Substrate und Endprodukte der Gluconeogenese.

Gluconeogenetische Schlüsselenzyme:

PC: Pyruvatcarboxylase

PEP-CK : Phosphoenolpyruvatcarboxykinase

FBP ase : Fructose-1,6-Bisphosphatase

G-6-Pase : Glucose-6-Phosphatase

I.) Methodische Vorarbeiten

1.) Zellulärer Glykogengehalt im Verlauf einer 5-tägigen Kultur

Abbildung 2 zeigt den Verlauf der zellulären Glykogenkonzentration während einer 5-tägigen Kultur.
Der Glykogengehalt pro Schale hat vom 1.bis zum 5.Tag der Kultur abgenommen.Die Relation von Glykogen zu Desoxyribonukleinsäure (DNS) blieb jedoch konstant.Dies weist darauf hin,daß der Glykogengehalt pro Zelle während der Kultur nicht absinkt.Errechnet man aus dem DNS-Gehalt einer Schale das äquivalente Gewebefeuchtgewicht (Barth &Willershausen,1978),kann man den Glykogengehalt der Kultur mit der Glykogenkonzentration in vivo vergleichen.
Der Glykogengehalt in Kultur betrug im Mittel 5,9µMol Glykogen x g Feuchtgewicht^{-1}.
Der Glykogengehalt in der Rattenleber nach 48 Stunden Hunger beträgt 4,2µMol Glykogen x g Feuchtgewicht^{-1} (Start & Newsholme,1968).Die Glykogenspiegel der Hepatozyten in Kultur entsprechen also unter den gewählten Bedingungen dem Glykogengehalt der Leber einer Ratte nach 48 Stunden Hunger.

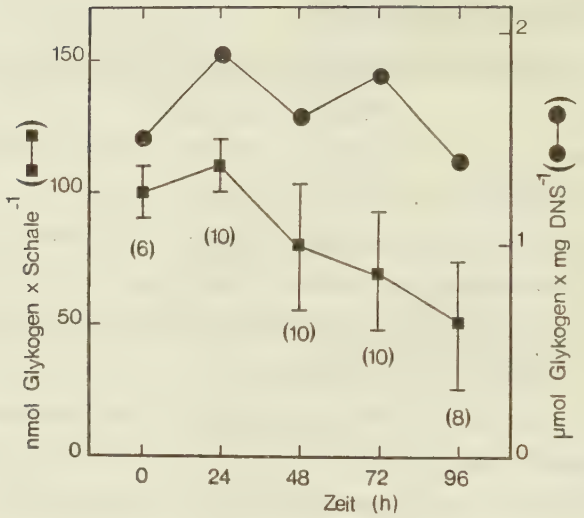

Abb.2: Verlauf des zellulären Glykogengehalts während einer 5-tägigen Kultur.
Die Zellen wurden in I^{++} mit 10 % FCS (siehe Experimenteller Teil I,1) ausgesät. 6 Stunden später wurden die Schalen mit I^{++} überschichtet. Dann erfolgte der Medienwechsel alle 24 Stunden mit I^{++} bis zum 5. Tag der Kultur.
Auf der Abszisse ist der Zeitpunkt der Glykogenbestimmung in Stunden nach der Aussaat aufgetragen, auf der linken Ordinate der Glykogengehalt bezogen auf eine Schale, auf der rechten Ordinate bezogen auf mg DNS. Die senkrechten Striche markieren die Standardabweichung des Mittelwerts (HK 37-41 auf Kollagengel).

2.) Hormonempfindlichkeit

a.) Glykogenolyse durch Adrenalin und Glucagon

Es ist weiter untersucht worden,ob der Hepatozyt in Kultur auf Hormone anspricht, die glykogenolytisch und gluconeogenesefördernd wirken.Die Anwendung eines solchen Hormons würde sich dann während des Gluconeogeneseexperiments in zweifacher Weise günstig auswirken:einmal würde keine Glykogenablagerung stattfinden,was zu falschniedrigen Gluconeogeneseraten führen würde,zum anderen würden die Gluconeogeneseraten auf Maximalwerte stimuliert. Die Hormonsensitivität ist nicht in allen Systemen gegeben.Während Glucagon an isolierten Lebereinzelzellen wirksam ist (Garrison & Haynes,1973).
sprechen Leberschnitte nicht auf Glucagon an (Ross et al.,1967).
Die Abbildungen 3 und 4 zeigen,daß 10^{-5}M Adrenalin bzw. 10^{-5}M Glucagon die Glykogenspiegel senken konnten.

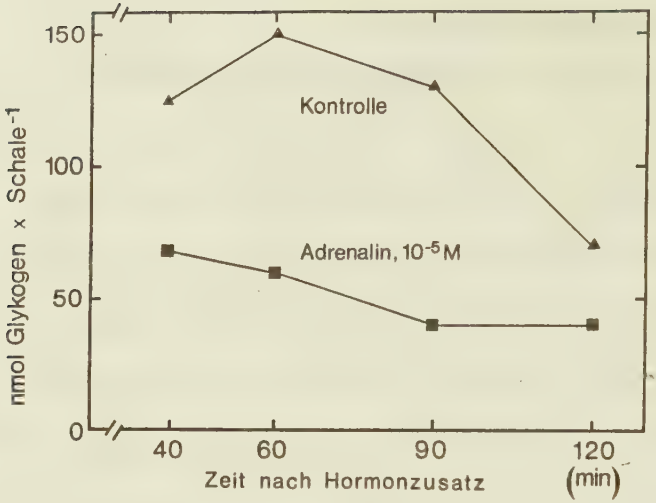

Abb.3: Glykogenolyse durch 10^{-5}M Adrenalin.
Am 3. Tag der Kultur wurden die Schalen mit Medium III-A (siehe Experimenteller Teil I, 1) plus 5 mM Alanin,5 mM Lactat,0,7 mM Pyruvat, 0,5 mM Oleat plus 0,4 % Albumin gewaschen (Waschtechnik II,siehe Experimenteller Teil I, 11) und bei 37°C ohne bzw. mit 10^{-5}M Adrenalin 40,60,90 und 120 Minuten unter Schütteln in einer Atmosphäre von 5 % CO_2 in Luft inkubiert. Die Ordinate gibt den Glykogengehalt pro Schale zu den verschiedenen Zeitpunkten an.
Der untere Kurvenverlauf gibt den Glykogengehalt nach Zusatz von 10^{-5}M Adrenalin wieder,der obere Kurvenverlauf zeigt die Glykogenspiegel in Kontrollkulturen (HK 41 auf Kollagengel).

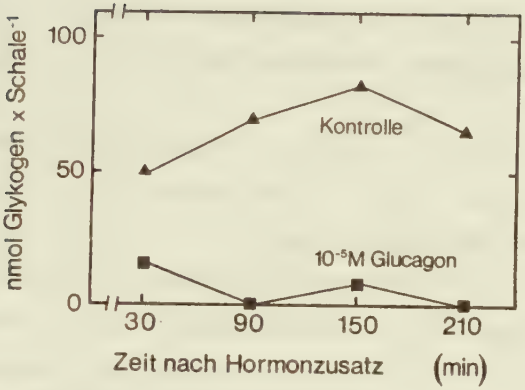

Abb. 4: Glykogenolyse durch 10^{-5}M Glucagon. Am 2. Tag der Kultur wurden die Schalen in I^{++} (siehe Experimenteller Teil I,1) bei 37°C ohne bzw. mit 10^{-5}M Glucagon 30,90, 150 und 210 Minuten im Inkubator gehalten. Die Ordinate gibt den Glykogengehalt pro Schale zu den verschiedenen Zeitpunkten an.

Der untere Kurvenverlauf gibt den Glykogengehalt nach Zusatz von 10^{-5}M Glucagon wieder,der obere Kurvenverlauf zeigt die Glykogenspiegel in Kontrollkulturen (HK 58 auf Falcon Plastik).

b.) Stimulierung der Tyrosintransaminase durch 10^{-5}M Dexamethasonphosphat

Die Syntheserate der hepatischen Tyrosintransaminase läßt sich in vivo durch Glucocorticoide erhöhen,was sich in einem Anstieg der Aktivität des Enzyms in der Leber äußert (Kenney,1962).Läßt sich also in einem Versuchsmodell ein vergleichbarer Anstieg der Tyrosintransaminase-Aktivität erzeugen,dann kann daraus gefolgert werden,daß das Versuchsmodell ein typisches Merkmal des Hepatozyten in vivo besitzt (Michalopoulos & Pitot,1975; Savage & Bonney,1978).
Die Antwort des Hepatozyten auf Dexamethasonphosphat ist für die Gluconeogeneseexperimente deshalb wichtig, weil dieses Glucocorticoid die Aktivität der gluconeogenetischen Schlüsselenzyme anhebt (Weber et al., 1965) und gerade die Aktivität dieser Enzyme nach den bisherigen Befunden (Gebhardt et al.,1978; Oliver et al.,1978) in der Kultur absinken.
Wie die Tabelle 3 zeigt,steigerte Dexamethasonphosphat auch unter unseren Bedingungen die Aktivität der Tyrosintransaminase.

Tabelle 3

Stimulierung der Tyrosintransaminase durch 10^{-5}M Dexamethasonphosphat

	Aktivität der Tyrosintransaminase (nmol p-Hydroxybenzaldehyd x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$)	(% der Kontrolle)
ohne Dexamethasonphosphat (n=12)	21,1 ±2,7	100
mit 10^{-5}M Dexamethasonphosphat (n=17)	41,5 ±4,8	197

Die Aktivität der Tyrosintransaminase wurde am 2. Tag der Kultur auf Plastik nach 6-stündiger Inkubation in mA (siehe Experimenteller Teil, I,1) ohne bzw. mit 10^{-5}M Dexamethasonphosphat bestimmt.
Es sind Mittelwerte ± Standardabweichung des Mittelwerts angegeben, n bedeutet die Anzahl der Experimente (HK 105, 119, 121, 129, 138, 140, 145, 170, 177, 179, 181 und 183 auf Falcon Plastik).

II.) 1.) Gluconeogenese am 2. und 4. Tag der Kultur

Vor Beginn des Gluconeogeneseexperiments wurde das Kollagengel mit dem angehefteten Hepatozytenmonolayer aus der Plastikschale gelöst und von der Glucose, die sich im Kulturmedium befindet,freigewaschen.
Die vorherige Entfernung der Glucose aus dem Kollagengel ist Voraussetzung für die nachfolgende Messung der Gluconeogeneseraten,denn die durch die Gluconeogenese entstehende Glucosemenge ist vergleichsweise gering gegenüber der großen Menge an Glucose,die im Kulturmedium und damit im Kollagengel vorhanden ist.
Zum Zeitpunkt 5 Minuten war nur noch um 0,3 µMol Glucose im Gel.Das bedeutet,daß die anfänglich vorhandene Konzentration von 8mM Glucose durch diese Maßnahme auf ungefähr 2,5% herabgesetzt worden ist (siehe Abbildung 5).

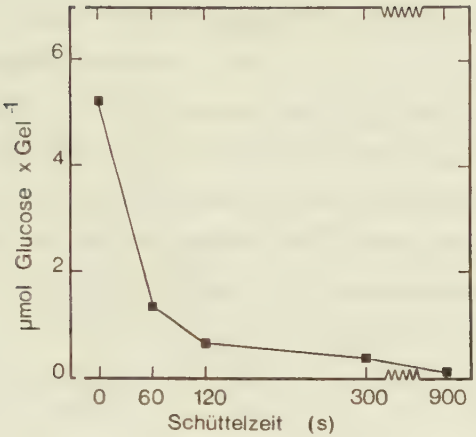

Abb.5: Auswaschen von Glucose aus dem Kollagengel.

Kollagengele wurden 24 Stunden bei 37°C im Inkubator in I^{++} (siehe Experimenteller Teil I,1) äquilibriert, anschließend wurden die Gele vom Plastik gelöst,das Kulturmedium abgesaugt und die Gele in Krebs-Ringer-Bicarbonat (siehe Experimenteller Teil I,1) unter leichtem Schütteln (Waschtechnik II,siehe Experimenteller Teil I,11) gewaschen.

Die Abszisse gibt die Dauer des Waschvorgangs in Sekunden an.Die Ordinate gibt an,wieviel µMol Glucose pro Gel nach Ende des Waschvorgangs noch im Gel vorhanden sind,wenn pro Gel ein Waschvolumen von 100 ml K.-R.-B. eingesetzt wird.

Abbildung 6 zeigt die Glucosebildung am 2.und 4.Tag der Kultur,wenn mit verschiedenen Substraten inkubiert wird. Bei der Wahl der Substratkonzentrationen richteten wir uns nach den Angaben von Hems (Hems et al.,1966),außerdem wurde dem Medium 2mM Octansäure beigefügt,um den stimulierenden Effekt von Fettsäuren auf die Gluconeogenese auszunutzen (Williamson,1967).

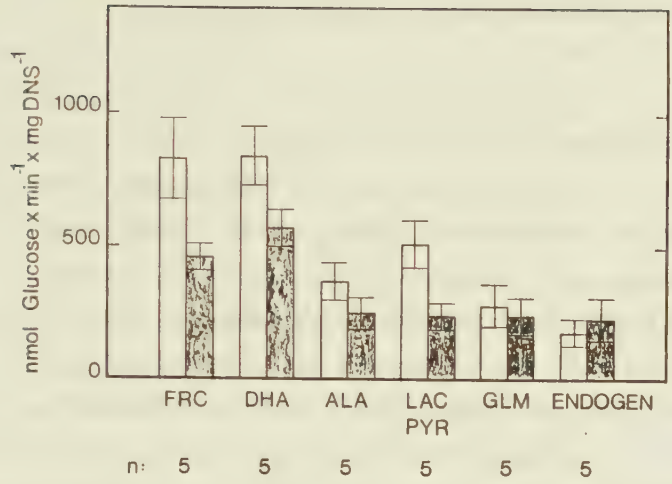

Abb.6: Glucosebildung am 2.und 4.Tag der Kultur. Die Kulturen wurden in I^{++}mit 10 % FCS (siehe Experimenteller Teil I,1) ausgesät,6 Stunden später wurde das Medium durch $I_{1:100}$ (siehe Experimenteller Teil I,1) ersetzt und bis zum 4.Tag der Kultur alle 24 Stunden erneuert.Am 2. und 4. Tag der Kultur wurden die Kollagengele vom Plastik gelöst und mit Waschtechnik II (siehe Experimenteller Teil I,11) behandelt.Während der 100-minütigen Schüttelinkubation bei 37°C im Wasserbad war 10^{-6}M Adrenalin in Medium III-A (siehe Experimenteller Teil I,1) zugesetzt. Außerdem wurden,neben 2mM Octansäure,die auf der Abszisse angegebenen Substrate in folgenden Konzentrationen eingesetzt:Dihydroxyaceton(DHA): 10 mM;Fructose(FRC):10 mM;Glutamin(GLM):10 mM; Alanin(ALA):10 mM;Lactat(LAC):10 mM;Pyruvat(PYR):

Forts. Legende Abb. 6

1 mM.
Nach 40 und 100 Minuten wurden den Inkubations-kolben Proben für die Glucosebestimmung entnommen. Nach der Inkubation wurden die Gele für die DNS-Bestimmung eingesetzt.
Die Ordinate gibt die Glucosebildung pro Minute bezogen auf mg DNS an.Die senkrechten Striche markieren die Standardabweichung des Mittelwerts, n bedeutet die Zahl der Experimente,helle Säulen zeigen die Raten am 2.Tag der Kultur,schraffierte Säulen die Raten am 4.Tag der Kultur an (HK 190, 192,193,196 und 199 auf Kollagengel).

Bezieht man Glucosebildungsraten in Kultur aus den verschiedenen Substraten nicht auf mg DNS, sondern auf g Leberfeuchtgewicht (Barth & Willershausen, 1978), kann mit Ergebnissen, die an der isoliert perfundierten Leber gewonnen wurden (Ross et al., 1967), verglichen werden. In beiden Systemen wird die Glucosebildung aus endogenen Raten von der Glucosebildung aus dem genannten Substrat abgezogen. Die Änderung des Glykogengehalts während des Gluconeogeneseexperiments kann vernachläßigt werden (siehe später). Tabelle 4 gibt das Ergebnis dieses Vergleichs am Beispiel von 4 Substraten wieder. Aus den Substraten Fructose, Dihydroxyaceton, Alanin und Glutamin wurde am 2. Tag der Kultur Glucose mit Raten gebildet, die mit der isoliert perfundierten Leber vergleichbar sind. Am 4. Tag der Kultur nahmen die Glucosebildungsraten für die genannten Substrate stark ab (siehe Diskussion A).

Tabelle 4

Gluconeogeneseraten am 2.und 4.Tag der Kultur im Vergleich zu Ergebnissen aus der isoliert perfundierten Leber

	Gluconeogeneseraten (µMol Glucose x min^{-1} x g $Feuchtgewicht^{-1}$)		
	in der isoliert perfundierten Leber[1]	am 2.Tag der Kultur[2]	am 4.Tag der Kultur[2]
Substrat (10mM)			
Fructose	2,54	2,28	0,80
Dihydroxyaceton	1,93	2,32	1,19
Alanin	0,52	0,67	0,08
Glutamin	0,31	0,35	0,03

[1] dem Vergleich lagen die Gluconeogeneseraten in der isoliert perfundierten Leber aus den genannten Substraten zugrunde; Glucosebildung ohne Zusatz von Substrat wurde jeweils abgezogen (Ross et al.,1967)

[2] die Werte wurden der Abbildung 6 entnommen.Die Glucosebildung aus zellulären Substraten wurde abgezogen und die Glucosebildungsraten auf g Leberfeuchtgewicht umgerechnet (Barth & Willershausen,1978).

Während des Gluconeogeneseexperiments wurden die Glykogenspiegel gemessen,um die Glucosebildung aus verschiedenen Substraten von Glykogenolyse abgrenzen zu können.

Tabelle 5 zeigt, daß die Änderung des Glykogengehalts während des Gluconeogeneseexperiments zu vernachlässigen war.Sie betrug in keinem Falle mehr als 7%.

Tabelle 5

Änderung der Glykogenspiegel während des Gluconeogeneseexperiments

Substrat:	FRC	DHA	ALA	LAC PYR	GLM	OHNE SUBSTRAT
Substrat- konzentration:	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM 1 mM	10 mM	

Glykogenkonzentration
(µMol x Schale^{-1})

	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
bei 40 min:	0,05	0,13	0,05	0,14	0,05	0,11	0,05	0,11	0,06	0,12	0,06	0,10
bei 100 min:	0,05	0,11	0,03	0,12	0,04	0,10	0,04	0,11	0,06	0,10	0,06	0,10

Änderung der Konzentration von (40-100 min) (µMol x Schale^{-1}):

	0,00	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00

Die Vorbehandlung und Inkubation der Gele erfolgte wie bei den Gluconeogeneseexperimenten (siehe Abbildung 6). Die Gele wurden nach 40 und 100-minütiger Inkubation mit den genannten Substraten zur Glykogenbestimmung eingesetzt. Auf diese Weise konnte die Änderung des zellulären Glykogengehalts während des Gluconeogeneseexperiments verfolgt und mit der Glucosebildung in Beziehung gesetzt werden. I gibt die Änderung der Glykogenspiegel am 2. Tag der Kultur, II am 4. Tag der Kultur während einer Inkubation wieder (HK 203 auf Kollagengel).

2.) Glucose-6-Phosphatase-Aktivität im Verlauf einer 4- tägigen Kultur

Wie in Tabelle 4 gezeigt, sanken die Glucosebildungsraten vom 2. zum 4. Tag der Kultur bei den Substraten Fructose und Dihydroxyaceton um ca. 57 %, bei den Substraten Alanin und Glutamin um ca. 90 %.

Möglicherweise beruht dieses Absinken der Gluconeogeneseraten auf einem Abfall der Aktivität gluconeogenetischer Schlüsselenzyme.

Andere Untersucher haben von einem Abfall der Aktivität gluconeogenetischer Schlüsselenzyme in der Hepatozytenkultur z.B. der Glucose-6-Phosphatase (Gebhardt et al., 1978) oder der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (Oliver et al., 1978) berichtet.

Auch wir haben einen Abfall der Glucose-6-Phosphatase-Aktivität während 4-tägiger Kultur beobachtet. Nach 24 Stunden sank die Aktivität auf 54 % des Ausgangswerts (Abbildung 7).

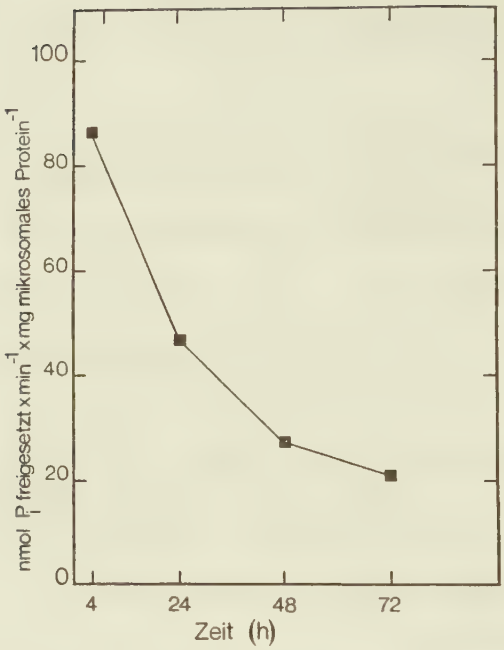

Abb.7: Aktivität der Glucose-6-Phosphatase im Verlauf einer 4-tägigen Kultur.
Die Kultur wurde in I^{++} mit 10 %FCS (siehe Experimenteller Teil I,1) ausgesät,6 Stunden nach der Aussaat wurde mit I^{++} (siehe Experimenteller Teil I,1) überschichtet und bis zum 4.Tag dieses Medium alle 24 Stunden erneuert.
Die Ordinate gibt an,wieviel nmol anorganisches Phosphat x min^{-1} x mg mikrosomales $Protein^{-1}$ frei-

Forts. Legende Abb. 7

gesetzt wird,auf der Abszisse ist die
Kulturdauer in Stunden aufgetragen.
Die Werte ergeben sich aus 2
Präparationen mit je 5 Schalen
(HK 44 auf Falcon Plastik).

3.) Gluconeogenese hormonbehandelter Kulturen am 2. und 4.Tag

Frisch isolierte Hepatozyten wurden in I^{++} mit 10 % FCS (siehe Experimenteller Teil I,1) ausgesät,nach 6 Stunden wurden dem Kulturmedium $I_{1:100}$ (siehe Experimenteller Teil I,1) die Hormone Triiodothyronin (10^{-6}M),Glucagon (10^{-6}M),Dexamethasonphosphat(10^{-6}M),Estradiol(10^{-6}M), Testosteron(10^{-6}M),Somatotropin(10 µg/ml) und Adrenalin (10^{-6}M)in den in Klammern bezeichneten Endkonzentrationen zugesetzt.Dieses Medium wurde bis zum 4.Tag der Kultur alle 24 Stunden erneuert.Am 2.und 4.Tag der Kultur sind Glucosebildungsraten aus verschiedenen Substraten und Veränderungen der Glykogenspiegel während des Gluconeogeneseexperiments bestimmt worden wie bereits beschrieben (Ergebnisse:II,1).
Abbildung 8 zeigt die Glucosebildung nach Zusatz verschiedener Substrate am 2. und 4.Tag von 5 hormonbehandelten Kulturen.

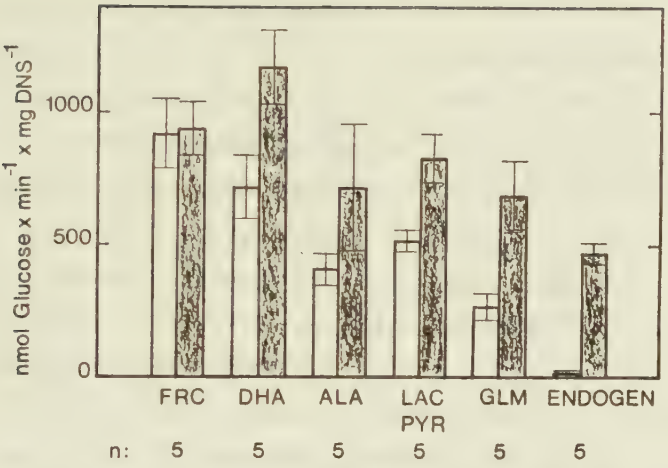

Abb.8: Glucosebildung hormonbehandelter Kulturen am 2. und 4. Tag.

Die Kulturen wurden in I^{++}mit 10 % FCS (siehe Experimenteller Teil I,1) ausgesät,6 Stunden später wurde das Medium durch $I_{1:100}$ (siehe Experimenteller Teil I,1) ersetzt,dem folgende Hormone zugesetzt waren:Triiodothyronin (10^{-6}M), Dexamethasonphosphat (10^{-6}M),Estradiol (10^{-6}M), Testosteron (10^{-6}M),Adrenalin (10^{-6}M),Somatotropin (10 µg/ml) und Glucagon (10^{-6}M).Bis zum 4.Tag der Kultur wurde dieses Medium alle 24 Stunden erneuert. Am 2. und 4.Tag der Kultur wurden die Kollagengele vom Plastik gelöst und mit Waschtechnik II (siehe Experimenteller Teil I,1) behandelt.Während der 100-minütigen Schüttelinkubation bei 37°C im Wasserbad war dem Medium III-A (siehe Experimenteller Teil I,1) 10^{-6}M Adrenalin zugesetzt.

Forts. Legende Abb. 8

Die auf der Abszisse angegebenen Substrate wurden in den bereits genannten Konzentrationen (Abbildung 6) eingesetzt. Für die Substrate wurden dieselben Abkürzungen verwendet (Abbildung 6).
Die Ordinate gibt die Glucosebildung pro Minute bezogen auf mg DNS wieder.
Die senkrechten Striche markieren die Standardabweichung des Mittelwerts, n bedeutet die Zahl der Experimente.
Helle Säulen zeigen die Raten am 2. Tag der Kultur, schraffierte Säulen am 4. Tag der Kultur (HK 190,192,193,196 und 199 auf Kollagengel).

Während bei den nicht-hormonbehandelten Kulturen (Abbildung 6) die Glucosebildungsraten am 2.Tag der Kultur für alle Substrate höher waren als am 4.Tag, zeigten die hormon-behandelten Kulturen einen Anstieg der Raten bis zum 4.Tag der Kultur (Abbildung 8).

Die Glucosebildungsraten der hormon-behandelten Kulturen wurden ebenfalls auf g Leberfeuchtgewicht umgerechnet (Barth &Willershausen,1978) und gegen die Glucosebildung aus zellulären Substraten korrigiert.Ein Vergleich dieser Gluconeogeneseraten mit den Gluconeogeneseraten unbehandelter Kulturen verdeutlicht,daß durch die Hormonbehandlung bereits am 2.Tag der Kultur eine Steigerung der Gluconeogenese erzielt wurde,die am 4.Tag der Kultur noch deutlicher war (Tabelle 6).

Man kann also schlußfolgern,daß das Absinken dieser Stoffwechselleistung der Hepatozyten in einem vollsynthetischen Medium ($I_{1:100}$) durch Zusatz eines Hormongemisches völlig verhindert werden kann.

Tabelle 6

Gluconeogenese unbehandelter und hormon-behandelter Kulturen am 2. und 4. Tag

Substrat:	FRC		DHA		ALA		LAC PYR		GLM	
Substratkonzentration:	10 mM		10 mM		10 mM		10 mM 1 mM		10 mM	
Gluconeogeneseraten (μMol Glucose x min^{-1} x g Feuchtgewicht^{-1})	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
in unbehandelten Kulturen:	2,28	0,80	2,32	1,19	0,67	0,07	1,16	0,03	0,35	0,03
in hormon-behandelten Kulturen:	3,16	1,58	2,46	2,46	1,37	0,88	1,76	1,26	0,88	0,77

Die Glucosebildungsraten wurden auf g Leberfeuchtgewicht bezogen (Barth & Willershausen, 1978) und die Glucosebildung aus zellulären Substraten abgezogen.

Dieser Tabelle liegen die Werte der Abbildung 6 (unbehandelte Kulturen) und der Abbildung 8 (hormon-behandelte Kulturen) zugrunde. I bezeichnet die Gluconeogeneseraten am 2. Tag der Kultur, II am 4. Tag der Kultur. Für die Substrate wurden die unter Abbildung 6 eingeführten Abkürzungen verwendet.

Wie bei unbehandelter Kultur (Tabelle 5) wurde auch in hormon-behandelter Kultur die Änderung der Glykogenspiegel während des Gluconeogeneseexperiments gemessen (Tabelle 7). Die Änderung des Glykogengehalts war auch in hormon-behandelter Kultur während des Gluconeogeneseexperiments gering und wurde aus diesem Grund bei Berechnungen der Gluconeogeneseraten hormon-behandelter Kulturen vernachläßigt.

Tabelle 8 belegt,daß in Kulturen, die über 4 Tage in $I_{1:100}$ mit den genannten Hormonen gezogen wurden, der Desoxyribonukleinsäuregehalt annähernd konstant blieb, während in Kulturen, die mit $I_{1:100}$ ohne weitere Hormone gefüttert wurden, der DNS-Gehalt sank.

Dieser Befund zeigt Wege auf,wie die Lebensdauer des Hepatozyten in Kultur durch Anwendung von bestimmten Hormonen verlängert werden kann.

Tabelle 7

Änderung der Glykogenspiegel während des Gluconeogeneseexperiments einer hormon-behandelten Kultur

Substrat:	DHA		LAC + PYR		GLM		OHNE SUBSTRAT	
Substrat-konzentration:	10 mM		10 mM + 1 mM		10 mM			
Glykogen-konzentration (μMol x Schale^{-1})	I	II	I	II	I	II	I	II
bei 40 min:	0,03	0,17	0,05	0,18	0,03	0,18	0,04	0,16
bei 100 min:	0,05	0,20	0,05	0,17	0,05	0,19	0,05	0,16
Änderung der Konzentration von (40-100 min): (μMol x Schale^{-1})	0,02	0,03	0,00	0,01	0,02	0,01	0,01	0,00

Die Vorbehandlung und Inkubation der Gele erfolgte wie bei den Gluconeogeneseexperimenten (siehe Abbildung 8).Die Gele wurden nach 40 und 100-minütiger Inkubation mit den genannten Substraten zur Glykogenbestimmung eingesetzt.Auf diese Weise konnte die Änderung des zellulären Glykogengehalts während des Gluconeogeneseexperiments verfolgt und mit der Glucosebildung in Beziehung gesetzt werden.Igibt die Änderung der Glykogenspiegel am 2.Tag der Kultur,II am 4.Tag der Kultur während einer Inkubation wieder (HK 203 auf Kollagengel).

Tabelle 8

Desoxyribonukleinsäuregehalt in unbehandelten und hormon-behandelten Kulturen am 2.und 4.Tag

	Desoxyribonukleinsäuregehalt (%)	
	2.Tag der Kultur	4.Tag der Kultur
in unbehandelten Kulturen (n=30)	91,7 ± 1,7	62,5 ± 1,7
in hormon-behandelten Kulturen (n= 30)	100 ± 2,1 *	87,5 ± 2,1 **

Die Kulturen wurden in I^{++} mit 10 % FCS (siehe Experimenteller Teil I,1) ausgesät,nach 6 Stunden wurde das Medium in einem Teil der Kulturen durch Gabe von $I_{1:100}$ (unbehandelte Kulturen),in einem anderen Teil durch $I_{1:100}$ mit den Hormonen $T_3(10^{-6}M)$,Dexamethasonphosphat($10^{-6}M$),Glucagon($10^{-6}M$), Adrenalin($10^{-6}M$),STH(10µg/ml),Estradiol($10^{-6}M$)und Testosteron($10^{-6}M$) (hormonbehandelte Kulturen) erneuert.Das Medium wurde jeweils alle 24 Stunden gewechselt.Die Gele wurden zur DNS-Bestimmung verwendet,nachdem

Forts.Legende Tab. 8

die Gluconeogeneseinkubation (siehe Abbildungen 6 und 8) beendet war.Es sind Mittelwerte ± Standardabweichung des Mittelwerts angegeben,n bedeutet die Zahl der Experimente.Der DNS-Gehalt von hormonbehandelten Schalen wurde als 100 % gesetzt.Die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten t-Test überprüft.

*:0,0005 < p < 0,0025, **:p<0,0005 (HK 190,192,193,196 und 199 auf Kollagengel).

B Regulation der HMG-CoA Reduktase-Aktivität durch Hormone und Substrate

Vorbemerkungen

Will man Hormon-oder Substrateinflüsse auf die Aktivität der HMG-CoA Reduktase untersuchen,bietet die Zellkultur gegenüber dem in vivo Modell oder der isoliert perfundierten Leber zwei Vorteile.

1.) Man kann in einem chemisch genau definierten Medium ein Hormon in bestimmter,gleichbleibender Konzentration zusetzen;die HMG-CoA Reduktase-Aktivität ist dabei unbeeinflußt von Lipoproteinen und anderen Serumkomponenten.

2.) Auch Effekte,die erst nach mehreren Tagen auftreten, sind in der Kultur der Beobachtung zugänglich.

Die folgenden Untersuchungen über die Beeinflussung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität durch Hormone haben gezeigt, daß die Zellkultur geeignet ist,Hormoneffekte voneinander abzugrenzen und Erkenntnisse darüber liefern kann,wie Hormone einzeln und im Zusammenspiel wirken können.

1.) Verlauf der HMG-CoA Reduktase-Aktivität während einer 4-tägigen Kultur

Da Hormon-und Substrateffekte über mehrere Tage studiert werden sollten,mußten zuerst die Basal-aktivität der HMG-CoA Reduktase während 4-tägiger Kultur in I^{++} Medium untersucht werden.

Die Befunde über den Verlauf der HMG-CoA Reduktase-Aktivität in Kultur in serum-und hormonfreiem Medium sind widersprüchlich (Breslow et al.,1977;Lin & Snodgrass, 1977).
Folglich war zu erwarten,daß die Aktivität der HMG-CoA Reduktase in einem Medium,welches zusätzlich in den ersten 6 Stunden foetales Kälberserum enthält und dem während der Kultur Insulin und andere Komponenten,wie Ölsäure und Albumin zugesetzt sind,anders verläuft als in serum-und hormonfreiem Medium.
Abbildung 9 zeigt den Verlauf der HMG-CoA Reduktase-Aktivität über 4 Tage Kultur.Die Aktivität der HMG-CoA Reduktase stieg stetig an.
Im Rahmen der Untersuchungen über den Einfluß von Ölsäure auf die Aktivität der HMG-CoA Reduktase wurde ein experimenteller Hinweis für die Deutung dieses Befundes gefunden (siehe später).

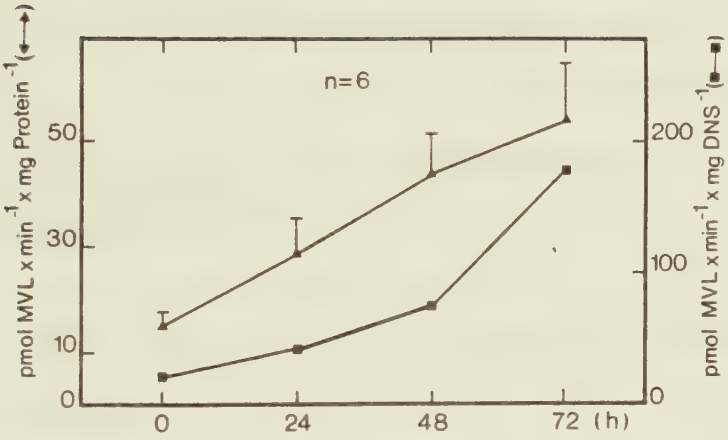

Abb.9: Verlauf der HMG-CoA Reduktase-Aktivität während 4-tägiger Kultur.
Die Kulturen wurden in I^{++}mit 10 % FCS (siehe Experimenteller Teil I,1) ausgesät,nach 6 Stunden wurde das Medium durch I^{++} (siehe Experimenteller Teil I,1) ersetzt und mit diesem Medium alle 24 Stunden bis zum 4. Tag der Kultur gefüttert.
Die Abszisse gibt die Dauer der Kultur in Stunden an.Die linke Ordinate gibt die spezifische Aktivität der HMG-CoA Reduktase bezogen auf mg mikrosomales Protein,die rechte Ordinate bezogen auf mg DNS wieder.Senkrechte Striche markieren die Standardabweichung des Mittelwerts,n gibt die Zahl der Experimente wieder (HK 99,103 und 104 auf Falcon Plastik).

2.) Einfluß verschiedener Hormone auf die HMG-CoA Reduktase-Aktivität

a.) Dexamethasonphosphat

Die Befunde über den Einfluß von Glucocorticoiden auf die HMG-CoA Reduktase-Aktivität in vivo sind widersprüchlich, da sie teils von einer Stimulierung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität sprechen (Mitropoulos & Balasubramaniam, 1976), teils von einer Hemmung (Nepokroeff et al., 1974).
Die Dosis der Glucocorticoide spielt eine wichtige Rolle (Cavenee & Melnykovych, 1979).
In der Hepatozytenkultur wurde bereits eine Stimulierung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität durch 10^{-5}M Dexamethasonphosphat in insulinfreiem Medium beobachtet (Lin & Snodgrass, 1977).
In unserem System steigerte Dexamethasonphosphat (10^{-5}M) die Aktivität der HMG-CoA Reduktase am 2. Tag der Kultur während 6-stündiger Inkubation um 142 % (siehe Tabelle 9). Dieser Anstieg war durch Zusatz von Cycloheximid (1,25 x 10^{-3} M) hemmbar.

Tabelle 9

Stimulierung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität durch 10^{-5} M Dexamethasonphosphat

	Aktivität der HMG-CoA Reduktase (pmol MVL x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$)	%
ohne Dexamethason-phosphat (n=8)	6,5 ±1,1	100
mit 10^{-5} M Dexamethasonphosphat (n=12)	15,7 ±2,9	242

Die Kulturen wurden in I^{++}mit 10 % FCS (siehe Experimenteller Teil I,1) ausgesät.Nach 6 Stunden wurde das Medium durch mA (siehe Experimenteller Teil I,1) ersetzt.Am 2. Tag wurde 6 Stunden lang in mA bzw. mA plus 10^{-5}M Dexamethasonphoshat inkubiert.

Es sind Mittelwerte ± Standardabweichung des Mittelwerts von n Experimenten angegeben (HK 105,119,121,129,138,140,145, 170,177,179,181 und 183 auf Falcon Plastik).

b.) Triiodothyronin

Die Stimulierung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität durch Schilddrüsenhormon ist in vivo an der hypothyreoten Ratte gezeigt worden (Gries et al.,1962;Guder et al., 1968),lange Latenzzeiten wurden bezüglich der Wirkung beobachtet (Guder et al.,1968;Ness et al.,1973).
In Kultur haben wir eine Stimulierung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität nach 48 Stunden Inkubation mit physiologischen und hohen Triiodothyroninkonzentrationen beobachtet (Abbildung 10).

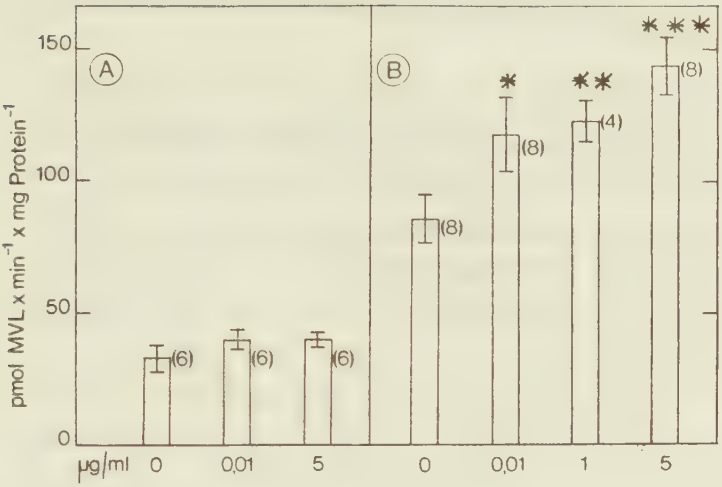

Abb.10: Stimulierung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität durch Triiodothyronin.

Die Kulturen wurden in I^{++}ausgesät,dem 10 % FCS (siehe Experimenteller Teil I,1) zugesetzt war,welches zur Entfernung von Schilddrüsenhormonen durch Kohleadsorption gereinigt worden war (siehe Experimenteller Teil I,9). Nach 6 Stunden wurde das Medium durch I^{++} (siehe Experimenteller Teil I,1) ersetzt, dann alle 24 Stunden erneuert. T_3 wurde vom Zeitpunkt der Aussaat und dann bei jedem Mediumwechsel in den Konzentrationen,die auf der Abszisse angegeben sind, zugesetzt. Nach 24-stündiger (A) und 48-stündiger (B) Inkubation wurde die HMG-CoA Reduktase-Aktivität bestimmt.Auf der Abszisse sind die T_3-Konzentrationen,auf der Ordinate die spezifische Aktivität bezogen auf mg mikrosomales Protein

Fortsetzung Legende Abb. 10 :

angegeben. Senkrechte Striche markieren die Standardabweichung des Mittelwerts für die in Klammern angegebene Anzahl von Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mit dem ungepaarten t-Test überprüft.

* $0{,}0250 < p < 0{,}0500$

** $0{,}0100 < p < 0{,}0125$

*** $p < 0{,}0005$

(HK 148,150;188 auf Falcon Plastik).

c.) Triiodothyronin und Dexamethasonphosphat

Wie unterschiedlich die Wirkung von Hormonen in Kombination ausfallen kann,die einzeln angewandt einen stimulierenden Effekt auf die HMG-CoA Reduktase-Aktivität haben,zeigen Befunde in vivo: eine Kombination von Triiodothyronin und Dexamethasonphosphat bewirkt eine Hemmung der Triiodothyronin-stimulierten HMG-CoA Reduktase-Aktivität (Dugan et al.,1974).

Hinweise dafür haben wir auch in Kultur erhalten.Mit der Kombination Triiodothyronin und Dexamethasonphosphat wurde eine Hemmung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität auf rund 70 % der Kontrolle beobachtet,während mit Triiodothyronin alleine eine Stimulierung auf rund 150 % erreicht wurde (Tabelle 10).

Tabelle 10

Einfluß von Triiodothyronin und Dexamethasonphosphat auf die Aktivität der HMG-CoA Reduktase

	Aktivität der HMG-CoA Reduktase (%)
Kontrolle	100
T_3 (5 µg/ml),Dexamethasonphosphat (10^{-6} M)	70
T_3 (5 µg/ml)	150

Die Kulturen wurden in I^{++} mit 10 % FCS (durch Kohleadsorption gereinigt) (siehe Experimenteller Teil I, 9) ausgesät, nach 6 Stunden wurde das Medium durch I^{++} (siehe Experimenteller Teil I,1) ersetzt. Vom Zeitpunkt 0 wurde 24 Stunden mit T_3 bzw. T_3 plus Dexamethasonphosphat in den genannten Konzentrationen inkubiert.Es sind Mittelwerte von zwei Kulturen angegeben (HK 152,154 auf Falcon Plastik).

d.) Glucagon

Es besteht keine Übereinstimmung, ob Glucagon in vivo unabhängig von Insulin eine hemmende Wirkung auf die HMG-CoA Reduktase-Aktivität ausüben kann. Teils wird die Wirkung des Glucagons darauf beschränkt, daß es die insulinbedingte Stimulierung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität verhindern kann (Lakshmanam et al., 1973), teils wird von Hemmeffekten berichtet, die unabhängig vom Insulin auftreten, in vivo (Huber et al., 1973) und in der Hepatozytenkultur (Lin & Snodgrass, 1977).
Wir haben am 2. Tag der Kultur nach 3-stündiger Inkubation mit Glucagon im Konzentrationsbereich 10^{-7} bis 10^{-11} M eine ca. 40 % ige Hemmung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität beobachtet (Abbildung 11).

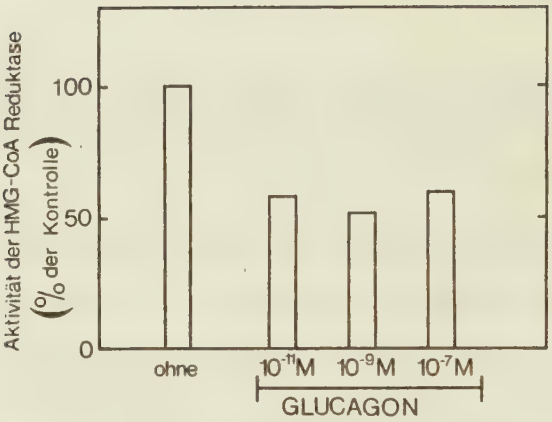

Abb.11: Hemmung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität durch Glucagon.

Die Zellen wurden in $I_{1:100}$ mit 10 % FCS (siehe Experimenteller Teil I,1) ausgesät. Nach 6 Stunden wurde das Medium durch $I_{1:100}$ ersetzt.Am 2.Tag der Kultur wurde viermal mit insulinfreiem Medium gewaschen und 3 Stunden vorinkubiert.Dann began eine 3-stündige Hauptinkubation in insulinfreiem Medium als Kontrolle und solchem,dem steigende Glucagonkonzentrationen zugesetzt waren. Die Aktivität der HMG-CoA Reduktase unter verschiedenen Glucagonkonzentrationen ist in % der unbehandelten Kontrolle angegeben . Es wurden Mittelwerte der Kulturen HK 108 und 110 gebildet (Kulturen auf Falcon Plastik).

e.) Hormone, die keinen Einfluß auf die Aktivität der HMG-CoA Reduktase hatten

Adrenalin, Noradrenalin

Befunde in vivo zeigen einen Anstieg der Cholesterolbiosynthese nach Catecholamingabe (Bortz, 1968).
Edwards beschreibt eine Stimulierung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität an isolierten Hepatozyten und postuliert einen direkten Effekt auf die Leberzelle. Voraussetzungen für eine Stimulierung sind dabei Zusatz von Serum und hohe Catecholaminkonzentrationen (Edwards, 1975).
Wir konnten diese Befunde nicht bestätigen. Sowohl nach Kurzzeit- als auch nach Langzeitinkubation (3 und 24 Stunden) mit den beiden Hormonen Adrenalin und Noradrenalin, - selbst unter Zusatz von foetalem Kälberserum-, ließen sich keine Effekte erkennen (Tabelle 11), denn der ca. 20 % ige Abfall war nicht dosisabhängig. Außerdem zeigte sich in anderen gleichartigen Experimenten entweder ein Anstieg oder Abfall in gleichem Ausmaße.

Tabelle 11

Einfluß von Adrenalin auf die Aktivität der HMG-CoA Reduktase

	Aktivität der HMG-CoA Reduktase (pmol MVL x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$)
Kontrolle	43
Adrenalin (10^{-9}M)	31
Adrenalin (10^{-5}M)	33

Die Kulturen wurden vom Zeitpunkt der Aussaat in I^{++}mit 10 % FCS (siehe Experimenteller Teil I,1) 3 Stunden mit den aufgeführten Konzentrationen von Adrenalin inkubiert (HK 120 auf Falcon Plastik).

Steroidhormone : Testosteron, Estradiol, Progesteron

Befunde in vivo sprechen teils von einer hemmenden Wirkung des Estradiols auf frühe Schritte der Cholesterolbiosynthese (Mukherjee & Bhose, 1968), teils von einer Förderung der Cholesterolbiosynthese und Triglyceridsekretion (Kissebah et al., 1973).
Testosteron und Progesteron senken die Aktivität der HMG-CoA Reduktase in vivo (Kandutsch & Packie, 1970).
Die genannten Hormone hatten in unserem System nach 24-stündiger Inkubation keinen Einfluß auf die HMG-CoA Reduktase-Aktivität (Tabelle 12).

Tabelle 12

Einfluß von Progesteron, Testosteron und Oestradiol auf die Aktivität der HMG-CoA Reduktase

	Aktivität der HMG-CoA Reduktase (pmol MVL x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$)
Kontrolle	21
Oestradiol (10^{-5}M)	21
Testosteron (10^{-5} M)	26
Progesteron (10^{-5} M)	30

Die Kultur wurde in I^{++} mit 10 % FCS (siehe Experimenteller Teil I,1) ausgesät. Nach 6 Stunden wurde der Kultur in I^{++} (siehe Experimenteller Teil I,1) 24 Stunden lang bis zum 2. Tag das entsprechende Steroidhormon in den genannten Konzentrationen zugesetzt ([illegible] 115 auf Falcon Plastik).

Corticotropin (ACTH)

Ein regulatorischer Einfluß dieses Hormons auf die Cholesterolbiosynthese ist nur an kultivierten Nebennierenzellen der Maus beschrieben worden (Faust et al.,1977). In unserem System zeigte das Hormon während 6-stündiger Inkubation keinen Effekt auf die HMG-CoA Reduktase-Aktivität (Tabelle 13).

Tabelle 13

Einfluß von Corticotropin auf die Aktivität der HMG-CoA Reduktase

	Aktivität der HMG-CoA Reduktase (pmol MVL x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$)
Kontrolle	34
Corticotropin (9,4 x 10^{-7}M)	36

Die Zellen wurden in I^{++} mit 10 % FCS (siehe Experimenteller Teil I,1) ausgesät,nach 6 Stunden wurde I^{++}(siehe Experimenteller Teil I,1) zugegeben. Am 2. Tag der Kultur wurde in I^{++} ohne bzw. mit 9,4 x 10^{-7} M Corticotropin 6 Stunden lang inkubiert (HK 130 auf Falcon Plastik).

Cholinerge Agenzien (Acetylcholin), Prostaglandine (Prostaglandin E_1 und E_2) und gastrointestinale Hormone (Gastrin und Sekretin) hatten keinen Einfluß auf die HMG-CoA Reduktase-Aktivität (siehe Tabellen 14,15 und 16).

Tabelle 14

Aktivität der HMG-CoA Reduktase unter Einwirkung von Acetylcholin

	Aktivität der HMG-CoA Reduktase (pmol MVL x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$)			
	1 min	2 min	5 min	10 min
Kontrolle	48	43	48	40
Acetylcholin (10^{-6} M)	50	39	47	34
Acetylcholin (10^{-4} M)	52	63	48	38

Die Kultur wurde in I^{++} mit 10 % FCS (siehe Experimenteller Teil I,1) ausgesät,nach 6 Stunden wurde das Medium durch I^{++}(siehe Experimenteller Teil I,1) ersetzt.Am 2.Tag wurde ohne bzw. mit den genannten Konzentrationen Acetylcholin 1,2,5 und 10 Minuten inkubiert (HK 135 auf Falcon Plastik).

Tabelle 15

Aktivität der HMG-CoA Reduktase unter Einwirkung von PGE_1

	Aktivität der HMG-CoA Reduktase (pmol MVL x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$)		
	0,5 min	5 min	10 min
Kontrolle	91	74	70
PGE_1 (5,6 x 10^{-9}M)	90	-	85
PGE_1 (5,6 x 10^{-7}M)	84	60	70

Die Kultur wurde in I^{++}mit 10 % FCS (siehe Experimenteller Teil I,1) ausgesät,nach 6 Stunden wurde das Medium durch I^{++} (siehe Experimenteller Teil I,1) ersetzt.Am 2.Tag wurde ohne bzw. mit den genannten Konzentrationen PGE_1 0,5,5 und 10 Minuten inkubiert (HK 137 auf Falcon Plastik).

Tabelle 16

Aktivität der HMG-CoA Reduktase unter Einwirkung von PGE_2

	Aktivität der HMG-CoA Reduktase (pmol MVL x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$)		
	0,5 min	5 min	10 min
Kontrolle	99	70	104
PGE_2 ($5,6 \times 10^{-9}$M)	133	100	99
PGE_2 ($5,6 \times 10^{-7}$M)	108	100	108

Kulturbedingungen und Art des Stops erfolgten wie bei HK 137, Tabelle 15 (HK 136 auf Falcon Plastik).

3.) Einfluß von Ölsäure auf die HMG-CoA Reduktase-Aktivität

Zufällig wurde beobachtet,daß die Aktivität der HMG-CoA Reduktase in ölsäure-und albuminhaltigem I^{++}-Medium höher war als in ölsäure-und albuminfreiem mA-Medium.
Dies gab Anlaß zur Untersuchung,wie schnell dieser stimulierende Effekt eintritt und wie lange er in Kultur erhalten bleibt.
Abbildung 12 zeigt den Anstieg der HMG-CoA Reduktase-Aktivität in I^{++}-Medium.Bereits nach 4 Stunden war sie in I^{++}-um 34 % höher als in mA-Medium.
Der größte Unterschied zwischen beiden Medien war nach 4 bis 6 Stunden erreicht.Nach 6 Stunden lag die Aktivität in I^{++}-Medium um 138 % höher als in mA-Medium.

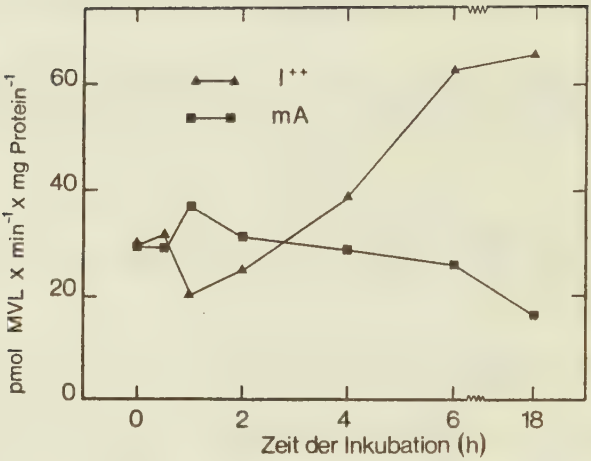

Abb.12: Verlauf der HMG-CoA Reduktase-Aktivität in I^{++}und mA Medium.

Die Zellen wurden in I^{++}mit 10 % FCS (siehe Experimenteller Teil I,1) ausgesät,nach 6 Stunden erfolgte der 1.Medienwechsel mit I^{++}(siehe Experimenteller Teil I,1).

Am 2.Tag der Kultur wurde das I^{++} Medium durch mA Medium (siehe Experimenteller Teil I,1) ersetzt und 6 Stunden in diesem Medium vorinkubiert.Zum Zeitpunkt 0 wurde die Hälfte der Schalen mit I^{++}überschichtet,die andere Hälfte bekam erneut mA.Zu den auf der Abszisse bezeichneten Zeitpunkten wurden Schalen gestoppt und die HMG-CoA Reduktase-Aktivität bestimmt (HK 155 auf Falcon Plastik).

Es wurde weiter untersucht,ob dieser stimulierende Effekt im I^{++}- Medium der Ölsäure oder dem Albumin zuzuschreiben ist und ob dieselbe Stimulierung auch erzielt wird,wenn äquivalente Mengen (bezogen auf Kohlenstoff !) einer mittelkettigen Fettsäure, z.B. Octansäure, angeboten werden.

Abbildung 13 zeigt,daß die Octansäure keinen Einfluß auf die Aktivität der HMG-CoA Reduktase hatte und daß Ölsäure einen eigenständigen positiven Effekt auf die HMG-CoA Reduktaseaktivität ausübt.

Wie Abbildung 13 weiter veranschaulicht, vermag auch der Zusatz von käuflichem Albumin alleine die Aktivität des Enzyms zu steigern.

Die Befunde der Abbildung 14 weisen darauf hin, daß diese im Albumin enthaltene aktivitätssteigernde Komponente durch Adsorption an Kohle entfernt werden kann.

Die folgenden Untersuchungen wurden deshalb mit Kohle gereinigtem Albumin durchgeführt.

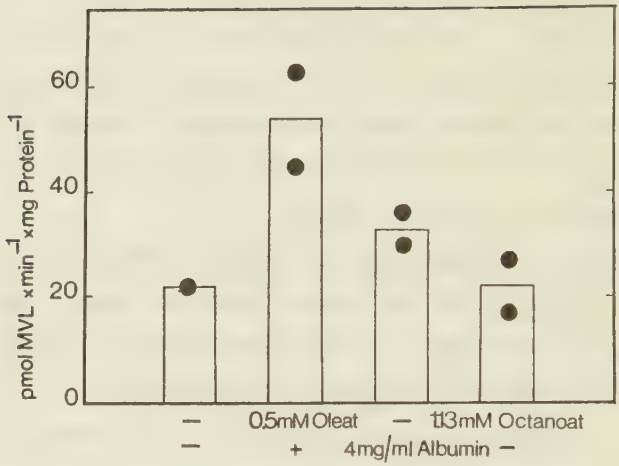

Abb.13: Einfluß von Ölsäure,Octansäure und Albumin auf die Aktivität der HMG-CoA Reduktase.

Die Kultur wurde in I^{++}mit 10 % FCS (siehe Experimenteller Teil I,1)ausgesät.Nach 6 Stunden wurde das Medium durch I^{++} (siehe Experimenteller Teil I,1) ersetzt,am 2. Tag 6 Stunden in mA Medium (siehe Experimenteller Teil I,1) vorinkubiert,dann erfolgte eine 6-stündige Hauptinkubation in mA Medium mit den auf der Abszisse angegebenen Komponenten.Die Säulen stellen die Mittelwerte aus je 2 Einzelbestimmungen (Werte der Einzelbestimmungen sind als Punkte wiedergegeben) der HMG-CoA Reduktase-Aktivität dar (HK 151 auf Falcon Plastik).

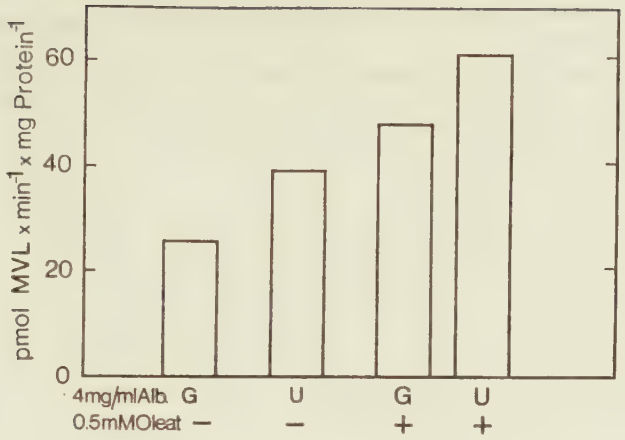

Abb.14: Einfluß von Albumin auf die Aktivität der HMG-CoA Reduktase.

Die Kultur wurde in I^{++} mit 10 % FCS (siehe Experimenteller Teil I,1) ausgesät. Nach 6 Stunden wurde das Medium durch I^{++} (siehe Experimenteller Teil I,1) ersetzt.Am 2. Tag wurde 6 Stunden in mA Medium (siehe Experimenteller Teil I,1) vorinkubiert, dann erfolgte eine 6-stündige Hauptinkubation in den auf der Abszisse bezeichneten Nährmedien.

" U " bedeutet Albumin "reinst" (Fa.Behring),

" G " bedeutet Albumin "reinst" nach Kohlebehandlung (HK 158 auf Falcon Plastik).

Abbildung 15 zeigt den Verlauf der HMG-CoA Reduktase-Aktivität einer 6-tägigen Kultur in I^{++}- bzw. mA- Medium. Es zeigte sich, daß der stimulierende Effekt der Ölsäure während der 6-tägigen Kultur stabil blieb.

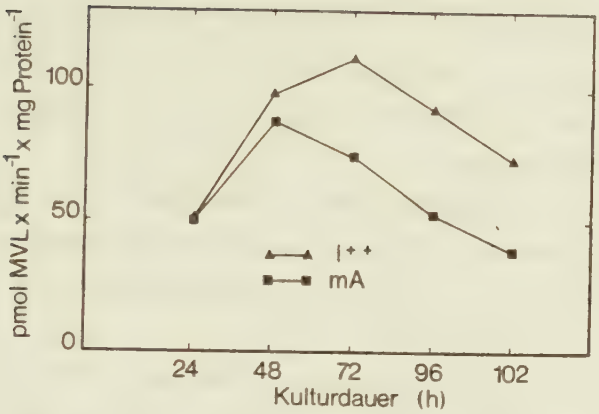

Abb.15: Verlauf der HMG-CoA Reduktase-Aktivität in I^{++} und mA Medium während einer 6-tägigen Kultur auf Kollagengel.
Die Kultur wurde in I^{++} mit 10 % FCS (siehe Experimenteller Teil I,1) ausgesät,nach 6 Stunden wurde das Medium durch I^{++} ersetzt (siehe Experimenteller Teil I,1) und die Kultur bis zum 2. Tag in diesem Medium gehalten.Am 2.Tag wurde die Kultur aufgespalten,in Schalen, die weiter I^{++} und solche,die von nun an mA-Medium (siehe Experimenteller Teil I, 1) erhielten.Zu diesem Zeitpunkt und alle 24 Stunden bis zum 6.Tag der Kultur wurden Schalen zur Bestimmung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität gestoppt (HK 156 auf Kollagengel).

Dann wurden die Oleatkonzentrationen variiert, um zu prüfen,welche Konzentration von Oleat einen maximalen Effekt auf die Aktivität der HMG-CoA Reduktase zeigt.

Es ließ sich zeigen,daß bei steigender Oleatkonzentration ein Maximum der HMG-CoA Reduktase-Aktivität bei 0,5 mM Oleat auftrat. Höhere Konzentrationen von Oleat hemmten die Aktivität.

Da bei den hohen Oleatkonzentrationen (> 0,5 mM) nicht auszuschließen ist,daß ein Teil der Fettsäure als nicht an Albumin gebunden,eine Detergentienwirkung ausüben könnte, wurde das Experiment mit einem großen Überschuß an Albumin wiederholt.

Abbildung 16 zeigt einen Anstieg der Aktivität bis 0,5 mM Oleat.

Auch bei dieser hohen Albuminkonzentration ließ sich durch weitere Erhöhung der Oleatkonzentration keine Steigerung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität hervorrufen.

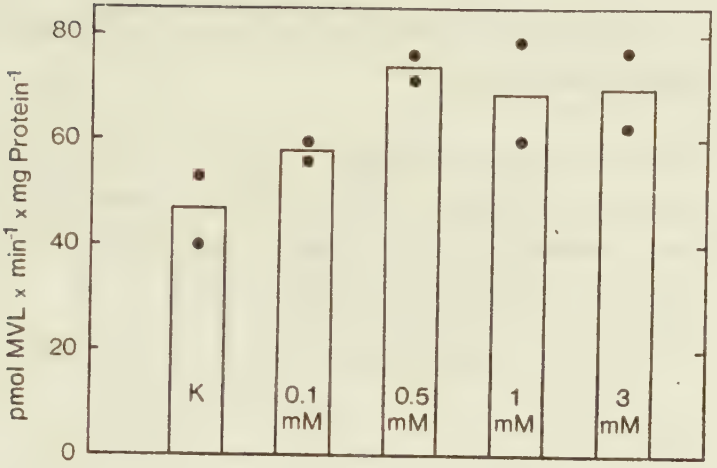

Abb. 16: Einfluß steigender Oleatkonzentrationen auf die Aktivität der HMG-CoA Reduktase.

Die Kultur wurde in I^{++} mit 10 % FCS (siehe Experimenteller Teil I,1) ausgesät,nach 6 Stunden wurde mit I^{++} (siehe Experimenteller Teil I,1) gewechselt.Am 2.Tag wurde 6 Stunden in mA Medium (siehe Experimenteller Teil I,1) vorinkubiert, dann erfolgte eine 6-stündige Hauptinkubation mit steigenden Oleatkonzentrationen von 0,1 mM bis 3 mM und einer Albuminkonzentration von 40 mg/ml (HK 164 auf Falcon Plastik).

4.) Effekt anderer langkettiger Fettsäuren auf die HMG-CoA Reduktase-Aktivität.

Abbildung 17 zeigt,daß Oleat (0,5 mM) von den auf der Abszisse genannten Fettsäuren,die in äquimolaren Konzentrationen eingesetzt wurden,den größten stimulierenden Effekt auf die Aktivität der HMG-CoA Reduktase ausübt.

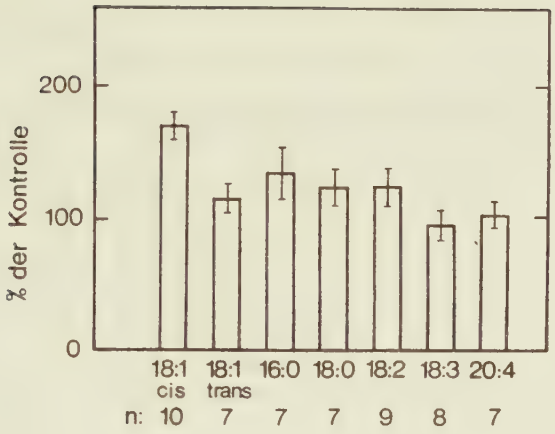

Abb.17: Effekt verschiedener ungesättigter und gesättigter Fettsäuren auf die Aktivität der HMG-CoA Reduktase.

Die Kulturen wurden in I^{++}mit 10 % FCS (siehe Experimenteller Teil I,1) ausgesät,nach 6 Stunden wurde das Medium durch I^{++} (siehe Experimenteller Teil I,1) ersetzt.Am 2.Tag wurde nach 6-stündiger Vorinkubation in mA Medium (siehe Experimenteller Teil I,1) mit verschiedenen Fettsäuren (0,5 mM) bei einer Albuminkonzentration von 4 mg/ml 6 Stunden in mA Medium inkubiert. Senkrechte Striche markieren die Standardabweichung des Mittelwerts,n gibt die Anzahl der Experimente wieder (HK 157 - 184 auf Falcon Plastik).

Fortsetzung Abb.17:
Für die verschiedenen Fettsäuren wurden unter der Abszisse die bereits eingeführten und erklärten Kurzschreibformeln (siehe Abkürzungen) verwendet.

DISKUSSION

A Gluconeogenese und Glykogenstoffwechsel in der Primärkultur

Der Stoffwechselweg der Glucoseneubildung aus Aminosäuren und anderen Vorläufern,wie Lactat,Pyruvat und Glycerin ist ein Prozess,der von fundamentaler Bedeutung für den Energiestoffwechsel des höheren Organismus ist.Er stellt ein charakteristisches Stoffwechselmerkmal der Leber dar.

Zur Beantwortung der Frage,ob Hepatozyten in Kultur ihre Stoffwechseleigenschaften bewahren,wurde die Gluconeogenesegeschwindigkeit zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur gemessen.

Wie bereits ausgeführt,kann die Geschwindigkeit dieses Stoffwechselwegs nur erfaßt werden,wenn gleichzeitig die Glykogenspiegel gemessen werden.

Die Glykogenkonzentrationen wiesen in der Primärkultur unter unseren Versuchsbedingungen sehr niedrige Werte auf.Sie lagen mit rund 6 µmol Glucoseäquivalenten x g Feuchtgewicht^{-1} bei Werten,wie sie in Lebern gehungerter Ratten gefunden wurden (Rawat et al.,1968).

Die Hepatozyten in Kultur antworten auf Glucagon- bzw. Adrenalinzusatz mit einer Steigerung der Glykogenolyse.

Sowohl durch die niedrigen basalen Glykogenkonzentrationen

als auch durch die glykogenolytische Wirkung der genannten Hormone ließen sich die Änderungen der Glykogenkonzentrationen während der Gluconeogenese-experimente gegenüber den Raten der Glucoseneubildung vernachlässigbar gering halten.

Diese Aussage trifft sowohl für den Hepatozyten in insulinhaltigem Kulturmedium,als auch für Zellen,die außerdem mit einer Reihe weiterer Hormone behandelt worden waren,zu.

Die Gluconeogeneseraten nehmen in insulinhaltigem Kulturmedium während 4-tägiger Primärkulturen sehr stark ab,z.B. für Lactat und Pyruvat um 97%,für Glutamin um 91%,für Alanin um 90%,für Fructose um 65% und für Dihydroxyaceton um 49%.

Die Glucosebildungsraten aus Substraten,die ausschließlich zytosolische gluconeogenetische Schlüsselenzyme passieren,liegen also höher als Glucosebildungsraten aus Substraten,die außerdem die mitochondrial lokalisierte Pyruvatcarboxylase durchlaufen.

Ob dies daran liegt,daß zytosolische Enzymaktivitäten in Primärkulturen von Hepatozyten bevorzugt verloren gehen,wie es von Gebhardt für Enzyme des Harnstoffzyklus beschrieben wurde (Gebhardt & Mecke,1979) oder ob Transportvorgänge über die innere Mitochondrienmembran limitierend werden,müßte durch künftige Untersuchungen geklärt werden.

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt,daß

durch Zusatz weiterer Hormone zum insulinhaltigen Kulturmedium der Abfall der Gluconeogeneseraten deutlich verzögert werden kann (Adrenalin,Glucagon, Dexamethason,17 ß-Estradiol,Testosteron,Wachstumshormon,L-Trijodthyronin).

So wird für das Substrat Dihydroxyaceton unter diesen Bedingungen kein Abfall der Glucosebildung beobachtet, für Fructose sinkt die Gluconeogeneserate lediglich um 50%,für Lactat und Pyruvat um 28%,für Alanin um 36% und für Glutamin um 12%.

Folgende Mechanismen lassen sich zur Erklärung der Hormonwirkung diskutieren:vermutlich stimulieren die Hormone Insulin,Dexamethason und Wachstumshormon auch in der Primärkultur die Gluconeogenese durch einen gesteigerten Aminosäureeinstrom in die Leberzelle (Riggs & Walker,1969; Kletzien et al.,1976).In vivo Versuche zeigen,daß Cortisol nach 24 Stunden die Aktivität der Pyruvatcarboxylase stimuliert (Walter,1976).17 ß-Estradiol und Testosteron wirken einer Dedifferenzierung während der Primärkultur entgegen (Decad et al.,1977).L-Trijodthyronin stimuliert die Proteinsynthese auf der Transkriptionsebene (Kurtz et al.,1976; Oppenheimer et al.,1979), indem es den Ribonukleinsäuregehalt in allen zellulären Fraktionen erhöht (Tata & Widnell,1966). Übereinstimmend mit anderen Autoren ließ sich feststellen,daß der Abfall des Desoxyribonukleinsäure-

gehalts,der in direkter Beziehung zur Zahl der intakten Zellen steht,in insulinhaltigem Kulturmedium nicht verhindert werden kann (Michalopoulos & Pitot,1975; Barth et al.,1977; Savage & Bonney,1978).Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen,daß die am frisch isolierten Hepatozyten beobachtete negative Stickstoffbilanz (Seglen,1977) auch unter den Bedingungen der Kultur negativ bleibt.

Mehrere Arbeitsgruppen haben sich bemüht,das Eintreten eines solchen Zustands durch weitere Zusätze zum Kulturmedium zu verhindern (Leffert,1974; Richman et al.,1976). Insbesondere hat sich herausgestellt,daß der Zusatz einer Mischung von Hormonen zu Zellkulturen den wachstumsfördernden Effekt des fötalen Kälberserums völlig ersetzen kann (Hayashi & Sato,1976).Für Hepatozytenkulturen gilt,daß Dexamethason die Anheftung der Zellen an die Zellunterlage begünstigt und damit eine zellerhaltende Funktion als Bestandteil des gewählten Hormongemisches ausübt (Richman et al.,1976 Williams et al., 1976).

Die vorliegenden Ergebnisse haben verdeutlicht,daß auch in diesem System Hormone für die Lebensfähigkeit der Zellen und die Aufrechterhaltung der organspezifischen Merkmale von größter Bedeutung sind.

B Regulation der HMG-CoA Reduktase-Aktivität durch Hormone und Substrate

Die Leber stellt sowohl für den Cholesterol- als auch für den Gallensäurestoffwechsel das zentrale Regulationsorgan dar.
Durch zwei Steroidkreisläufe schafft sie zum einen die Verbindung zum Außenmilieu,d.h. zu den Lipiden,die durch die Nahrung aufgenommen werden,zum anderen versorgt sie andere Organe mit Cholesterol,der Grundsubstanz für Membranaufbau und Steroidbiosynthese.
Abbildung 18 verdeutlicht,welche Organsysteme jeweils durch die beiden Stoffwechselprodukte verbunden werden.
Die Cholesterol-de novo-Synthese in der Leber beträgt ca. 0,5 g pro Tag beim erwachsenen Menschen.
Für das in der Leber neu synthetisierte und gespeicherte Cholesterol kommen drei Stoffwechselwege in Betracht (siehe Abb.18):

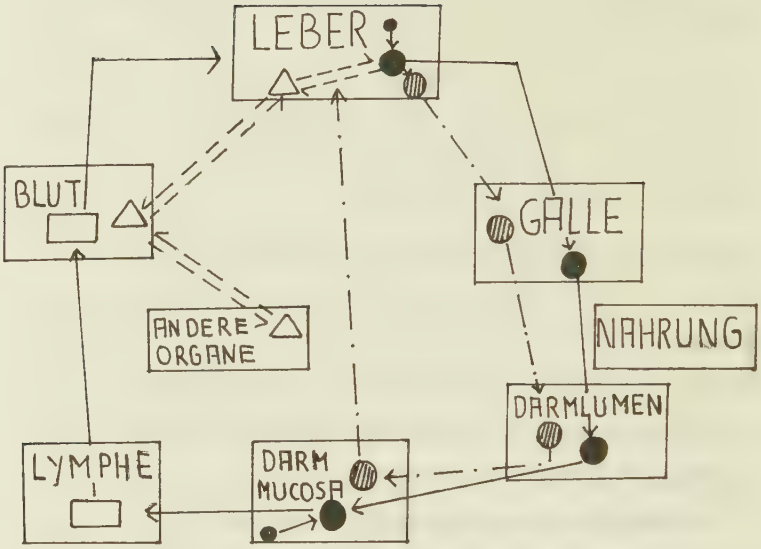

Abb. 18: Cholesterol - und Gallensäurekreislauf :
● : Acetat, ● : Cholesterol, ◍ : Gallensäuren,
▭ : Chylomikronen, △ : Lipoproteine,
: Gallensäurekreislauf, : Cholesterol-
kreislauf, : Weg der "very low density" und
"low density" Lipoproteine

1.) Der Kreislauf des in der Leber neusynthetisierten und gespeicherten Cholesterols beginnt mit dem Transport in die Galle;von dort setzt er sich in das Darmlumen fort,wo Cholesterol ausge-

schieden oder in die Darmmucosazelle rückresorbiert werden kann.Das rückresorbierte Cholesterol wird durch de novo synthetisiertes ergänzt und geht über die Lymphe in Form von Chylomikronen weiter zur Blutbahn.
Die Chylomikronen stellen die Transportform dar,mittels der Cholesterol in die Leber gelangt.Dabei werden triglyzeridarme Chylomikronenreste zur Leber transportiert,wodurch der enterohepatische Kreislauf geschlossen wird.
Durch das in der Leberzelle gespeicherte Cholesterol wird ein direkter Effekt auf die Aktivität des Schlüsselenzyms,die HMG-CoA Reduktase,ausgeübt.Werden der Leberzelle große Mengen Cholesterol zugeleitet,wird die Aktivität der HMG-CoA Reduktase gehemmt. Dies konnte sowohl in vivo (Hamprecht et al.,1969) als auch in isolierten Hepatozyten (Edwards,1975) nachgewiesen werden.

2.) Aus Cholesterol werden in der Leberzelle Gallensäuren synthetisiert,die durch den in der Abbildung 18 gezeichneten Gallensäurekreislauf ins Darmlumen transportiert ,von dort aus von der Mucosazelle resorbiert und via Pfortader der Leberzelle zugeleitet

werden.
Die Gallensäuren üben auf die HMG-CoA Reduktase einen direkten hemmenden Effekt aus,wobei der Mechanismus dieser Hemmung noch ungeklärt ist (Hamprecht et al.,1971).

3.) Die Leberzelle sezerniert Cholesterol in Form von Lipoproteinen.Das so verpackte Cholesterol kann nur dann in eine Empfängerzelle gelangen,wenn diese einen für das Lipoprotein spezifischen Rezeptor besitzt.
Ein Modell für diese Art von Cholesterolaufnahme stellt der Fibroblast dar,dessen Plasmamembran einen spezifischen "low density lipoprotein"-Rezeptor hat,an den das Lipoprotein angeheftet wird.Nach Internalisierung fusioniert das Lipoprotein mit einem Lysosom und durch entsprechende lysosomale Enzyme erfolgt die Hydrolyse in Lipidanteile und Aminosäuren.
Das dabei freigesetzte Cholesterol hemmt die HMG-CoA Reduktase (Brown & Goldstein, 1976).
Während in den letzten Jahren an peripheren Geweben viele Erkenntnisse über die Wechsel - wirkung von Lipoproteinen und ihren Cholesterolanteil gewonnen wurden (Brown,Faust & Goldstein, 1975; Brown & Goldstein,1976 ; Balasubramaniam, Goldstein,Faust & Brown,1976; Balasubramaniam, Goldstein,Faust,Brunschede & Brown,1977),liegen über

die Regulation des hepatischen Cholesterolstoffwechsels auf der zellulären Ebene relativ wenige und zum Teil widersprüchliche Daten vor. Deshalb erschien die Entwicklung eines hepatischen in vitro-Systems, in dem die Regulation der Cholesterolbiosynthese und seines geschwindigkeitsbestimmenden Schlüsselenzyms, der HMG-CoA Reduktase, über Tage studiert werden kann, erstrebenswert.

Hormonelle Einflüsse

Schilddrüsenhormone. Die Bestimmung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität nach 24- und 48-stündiger T_3-Inkubation in insulinhaltigem Kulturmedium zeigt, daß Trijodthyronin die HMG-CoA Reduktase-Aktivität in der Primärkultur erst nach 48 Stunden erhöht. Die lange Latenzzeit der Wirkung ist auch von in vivo-Befunden bekannt (Guder et al., 1968).
Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß Schilddrüsenhormone, entgegen anderslautenden Befunden (Gries et al., 1962; Tata et al., 1963), in einem in vitro-System, wie es die Primärkultur darstellt, auf den Cholesterolstoffwechsel wirken können.

Glucocorticoide. Versuche an adrenalektomierten Ratten erbrachten Hinweise,daß der diurnale Rhythmus der HMG-CoA Reduktase-Aktivität vor allem durch Glucocorticoide verursacht wird.Da dieser Anstieg cycloheximidsensitiv ist,kann auf eine vermehrte Synthese des Enzyms geschlossen werden (Mitropoulos & Balasubramaniam,1976).

In vitro konnte ein Effekt an zwei Systemen gezeigt werden: in HeLa S3 G Zellen (Cavenee & Melnynkovych,1979) und in der Hepatozytenkultur (Lin & Snodgrass,1977).

In unserem Kultursystem wurde die Aktivität der HMG-CoA Reduktase nach 6-stündiger Inkubation mit Dexamethasonphosphat (10^{-5}M) verdoppelt,ein Effekt,der ebenfalls cycloheximidhemmbar war.

Die Glucocorticoidwirkung auf den Cholesterolstoffwechsel und das geschwindigkeitsbestimmende Enzym,die HMG-CoA Reduktase,ist ein komplexer, noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärter Regulationsmechanismus.Ein paradoxer Effekt ist beispielsweise die Stimulierung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität bei gleichzeitigem Absinken des ^{14}C-Acetateinbaus in Cholesterol (Cavenee & Melnynkovych,1977) .

Sexualhormone. In-vivo-Effekte einzelner Steroidhormone auf die Aktivität der HMG-CoA Reduktase sind insofern schwierig zu deuten, als sich die Hemmwirkung sowohl zeit- als auch dosisabhängig erwies (Kandutsch & Packie, 1970).

Fütterungsexperimente lassen auch deshalb keine eindeutigen Aussagen zu, weil die Darmresorption für die einzelnen Steroidhormone unterschiedlich ist und zwangsläufig unterschiedliche Steroidkonzentrationen auf die Leberzelle wirken.

Als inhibitorisch wirksam gilt die Δ^4 -3-Ketogruppierung des A-Rings eines Steroidhormons, während die Beschaffenheit der Seitenketten für die Hemmwirkung von untergeordneter Bedeutung war (Kandutsch & Packie, 1970).

In unseren Untersuchungen konnte nach 24-stündiger Inkubation mit 17ß-Estradiol, Progesteron und Testosteron kein Einfluß auf die basale Aktivität der HMG-CoA Reduktase festgestellt werden. Dieser Befund steht in Einklang mit Ergebnissen, die an den bereits erwähnten HeLa S3 G Zellen gewonnen wurden, nämlich, daß Progesteron (10^{-6} M) nach 18-stündiger Inkubation keine Veränderung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität verursachte. Wurde jedoch gleichzeitig mit Dexamethasonphosphat (10^{-7} M) stimuliert, konnte durch

Progesteron eine Hemmwirkung um 75 % erzielt werden (Cavenee & Melnynkovych,1979).
An Zellkulturen von Hepatomzellen wurde die Rolle des Progesterons als kompetitiver Inhibitor des Glucocorticoidrezeptors bereits beschrieben (Samuels & Tomkins,1970).

Gastrointestinale Hormone. Untersuchungen an Hunden haben gezeigt,daß gastrointestinale Peptidhormone,wie Cholecystokinin,Caerulein , Gastrin II und Secretin die Gallesekretion stimulieren (Jones & Grossman,1970).
Wenn gastrointestinale Hormone die Sekretion der Gallensäuren erhöhen können,sollte das eine Stimulierung der Syntheserate von Gallensäuren nach sich ziehen.Dies wiederum könnte einen erhöhten intrazellulären Cholesterolbedarf für die Gallensäuresynthese verursachen.Man kann deshalb die Frage stellen, ob gastrointestinale Hormone einen direkten Effekt auf die HMG-CoA Reduktase ausüben und so das für die Gallensäuresynthese benötigte Cholesterol bereitstellen.
In der Primärkultur blieben die beiden Hormone Gastrin und Sekretin jedoch ohne Effekt auf die Aktivität des Enzyms.

Catecholamine. Bortz hat 12 Stunden nach intraperitonealer Gabe von Noradrenalin an gefütterte Ratten einen Anstieg der hepatischen Cholesterolbiosynthese aus ^{14}C-markiertem Acetat gemessen, gleichzeitig blieb der Umsatz von ^{14}C-markiertem Mevalonat zu ^{14}C-markiertem Cholesterol unverändert (Bortz,1968).Dieser Effekt konnte jedoch nicht beobachtet werden,wenn isolierte Leberschnitte mit Noradrenalin inkubiert wurden. Deshalb hat Bortz vorgeschlagen,daß Noradrenalin primär auf das Fettgewebe wirkt und die hepatische Cholesterolbiosynthese indirekt durch die Freisetzung von Fettsäuren in das Serum stimuliert wird (Bortz,1968).

Edwards dagegen zeigte,daß die beiden Hormone Adrenalin und Noradrenalin direkt auf den isolierten Hepatozyten wirken und die Aktivität der HMG-CoA Reduktase stimulieren (Edwards,1975). Unter unseren Kulturbedingungen hatten Adrenalin und Noradrenalin (10^{-5}M,10^{-9}M) keinen Einfluß auf die Aktivität der HMG-CoA Reduktase,weder auf frisch isolierte Hepatozyten,noch auf Hepatozyten,die sich seit 24 Stunden in Primärkultur befanden.

Wurden dem Kulturmedium jedoch langkettige Fettsäuren zugesetzt,fand eine Erhöhung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität statt (siehe später),d.h. unter Kulturbedingungen,die dem in vivo-Zustand nach erfolgter Lipolyse ähnelten.

Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit der Hypothese von Bortz, nämlich, daß Catecholamine nur indirekt über einen lipolytischen Effekt am Fettgewebe auf die hepatische Cholesterolsynthese wirken und keinen direkten Einfluß auf die Aktivität der hepatischen HMG-CoA Reduktase haben.

Wirkung langkettiger Fettsäuren

Durch Vergleich der HMG-CoA Reduktase- Aktivität in ölsäurehaltigem-und ölsäurefreiem Standard-kulturmedium wurde zufällig entdeckt,daß die spezifische Aktivität im erstgenannten Fall doppelt so hoch war wie im ölsäurefreiem Kultur-medium.Dieser Befund gab Anlaß zu weiter-führenden Untersuchungen.Die vorliegenden Ergebnisse zeigten,daß die Aktivität der HMG-CoA Reduktase durch steigende Oleatkonzentrationen im Kulturmedium stimuliert wurde.Wurden dem Hepatozyten mit dem Kulturmedium gleiche Kohlen-stoffeinheiten einer mittelkettigen Fettsäure (Octansäure) angeboten,blieb die Stimulierung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität aus.Den größten Anstieg der HMG-CoA Reduktase-Aktivität verur-sachte 0,5 mM Ölsäure (ca.60%),während äqui-molare Konzentrationen von Palmitinsäure, Stearinsäure oder Linolsäure nur einen mäßigen Anstieg der HMG-CoA Reduktase-Aktivität be-wirkten und die vielfach ungesättigten Fett-säuren keinen Einfluß auf die HMG-CoA Reduktase-Aktivität hatten.
Dieser Befund bestätigt frühere Daten am System der isoliert perfundierten Leber,welche eine

Steigerung der Freisetzung von "very-low-density" Lipoproteinen durch langkettige Fettsäuren mit einer gleichzeitigen Anhebung der HMG-CoA Reduktase-Aktivität korrelierten (Goh & Heimberg,1977) . Die Triglyzeridmenge,die bei diesen Untersuchungen in das Perfusat abgegeben wurde,war von der Struktur der angebotenen Fettsäure abhängig.Die Triglyzeridmenge nahm mit steigender Kettenlänge zu und erreichte bei 18 C-Atomen ein Maximum,mit zunehmender Zahl der Doppelbindungen im Fettsäuremolekül nahm sie ab (Kohout et al.,1971).

Möglicherweise findet dieser Befund seine Erklärung in der Tatsache,daß hauptsächlich Fettsäuren mit 16 C- und 18 C-Atomen,wie Palmitin-,Stearin-und Ölsäure mit Glycerol verestert werden und im Triglyzeridmolekül die C-1 und C-3 Positionen einnehmen,während mehrfach ungesättigte Fettsäuren nur in C-2 Stellung mit dem Glycerol verestert werden können und im Triglyzeridmolekül mengenmäßig hinter den oben genannten Fettsäuren zurückstehen.Mittelkettige Fettsäuren (z.B.Octansäure) werden um das ca. 5-6 Fache weniger in lipidlösliche Produkte der Leber eingebaut als langkettige Fettsäuren (z.B. Palmitinsäure).Dies konnte nach intraportaler Injektion der genannten ^{14}C-markierten Fettsäuren in lebende Ratten und anschließender Lipidextraktion gezeigt werden (Scheig & Klatskin, 1968).Noch auffälliger war dieser Unterschied bei Leberschnittpräparaten:nach 2-stündiger Inkubation wurden aus ^{14}C-markierter Palmitinsäure um das 22 Fache mehr lipidlösliche Produkte, die zur Hälfte aus Triglyzeriden bestanden,gebildet

als aus ^{14}C-markierter Octansäure. Die Markierung der Octansäure fand sich fast ausschließlich im $^{14}CO_2$ wieder (Scheig & Klatskin, 1968). Mittelkettige Fettsäuren unterliegen demnach vorwiegend der ß-Oxidation und können in nur geringerem Maße zur Triglyzeridsynthese ausgenutzt werden.

Wir neigen deshalb der Hypothese zu, daß mit der durch Ölsäure stimulierten Triglyzeridsynthese und VLDL-Sekretion ein vermehrter Ausstrom von Cholesterol aus der Leberzelle erfolgt, wodurch möglicherweise die negative Rückkopplung auf die HMG-CoA Reduktase entfällt und eine Erhöhung der Aktivität resultiert (Edwards et al., 1976; Goh & Heimberg, 1977).
In der Tat synthetisieren frisch isolierte Hepatozyten und Primärkulturen von Hepatozyten Triglyzeride und geben sie in Form von VLDL-Lipoproteinen ab (Jeejeebhoy et al., 1975; Davis et al., 1979).
Auch in unserem Kultursystem waren günstige Voraussetzungen für eine VLDL-Synthese gegeben: physiologische Glucosekonzentrationen (8mM) und Fettsäuren (0,5mM) wurden dem Kulturmedium zugesetzt.
Es bleibt künftigen Arbeiten überlassen, die Synthese von "very-low-density" Lipoprotein in unserem System zu quantifizieren und mit der HMG-CoA Reduktase-Aktivität zu korrelieren.

Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit konnte bestätigt werden, daß Primärkulturen von Hepatozyten erwachsener Ratten ein geeignetes Modell darstellen, die Physiologie der Leber zu studieren.

Die Fähigkeit Glucose aus verschiedenen Substraten zu bilden, bleibt in Kultur erhalten. Glucosebildungsraten aus verschiedenen Substraten sind am 2. Tag der Kultur mit Raten vergleichbar, die am Modell der isoliert perfundierten Leber gefunden wurden.

Die Gluconeogeneseleistung und der Desoxyribonukleinsäuregehalt des Hepatozyten fällt unter den gewählten Versuchsbedingungen bis zum 4. Tag der Kultur ab.

Durch Zusatz von bestimmten Hormonen zum Kulturmedium (Adrenalin,Glucagon,Dexamethasonphosphat, Triiodothyronin,Somatotropin,Testosteron und Estradiol) konnte die Überlebensfähigkeit des Hepatozyten in der Primärkultur verbessert werden :

1.) Der Abfall des Desoxyribonukleinsäuregehalts konnte in Gegenwart der genannten Hormone verzögert werden.

2.) Die Fähigkeit aus bestimmten Substraten Glucose zu bilden, blieb in Gegenwart der genannten Hormone bis zum 4. Tag der Kultur erhalten.

Primärkulturen von Hepatozyten erwachsener Ratten haben sich als ein geeignetes Modell erwiesen, Stoffwechselleistungen der Leber in Kultur zu messen und Regulationsmechanismen zu studieren.
Die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase, eines Schlüsselenzyms der Cholesterolbiosynthese wurde in Kultur bestimmt.
Es konnte gezeigt werden, daß die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase im Verlauf einer 6-tägigen Kultur ansteigt. Dieser Anstieg wurde in ölsäurehaltigem Kulturmedium beobachtet, nicht jedoch in ölsäure- und albuminfreiem Medium.
Ein Vergleich mit anderen physiologischen Fettsäuren hat gezeigt,daß die Aktivität der HMG-CoA- Reduktase am meisten durch Ölsäure beeinflußt wird.
Unter den gegebenen Kulturbedingungen wurde die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase durch Dexamethasonphosphat und Triiodothyronin erhöht, durch Glucagon gesenkt.
Es wurde durch die vorliegenden Untersuchungen nicht geklärt, welcher Regulationsmechanismus diesen Befunden zugrunde liegt.

Baginski,E.S.,Foa,P.P.& Zak,B.(1974):Glucose-6-phosphatase. In:Methoden der enzymatischen Analyse(Bergmeyer,H.U.,Hrsg.), Bd.1,909-913,Verlag Chemie Weinheim/Bergstr.

Balasubramaniam,S.,Goldstein,J.L.,Faust,J.R.& Brown,M.S. (1976):Evidence for regulation of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase activity and cholesterol synthesis in non hepatic tissues of rat,Proc.Natl.Acad. Sci.USA 73,2564-2568

Balasubramaniam,S.,Goldstein,J.L.,Faust,J.R.,Brunschede, G.Y.& Brown,M.S.(1977):Lipoprotein mediated regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and cholesteryl ester metabolism in the adrenal gland of the rat,J.Biol.Chem. 252,1771-1779

Barth,C.A.,Willershausen,B.S.,Walther,B.& Weis,E.E.(1977): Morphologie und Stoffwechsel von Hepatozyten erwachsener Ratten in der Primärkultur,Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 358,211

Barth,C.A.& Willershausen,B.S.(1978):Improvement of DNA quantitation following proteolytic extraction,Anal. Biochem. 90,167-173

Bergmeyer,H.U.,Bernt,E.,Schmidt,F.& Stork,H.(1974): D-Glucose Bestimmung mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase.In:Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer,H.U.Hrsg.),Bd.2,1241-1259,Verlag Chemie Weinheim/Bergstr.

Bergström,S.(1967):Prostaglandins:Members of a new hormonal system,Science 157,382-391

Bernaert,D.,Wanson,J.-C.,Drochmans,P.& Popowski,A. (1977):Effect of insulin on ultrastructure and glycogenesis in primary cultures of adult rat hepatocytes,J.Cell Biol. 74,878-900

Berndt,J.& Gaumert,R.(1971):Eine vereinfachte Methode zur Bestimmung der Hydroxymethylglutaryl-CoA Reduktase, Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.352,345-350

Berry,M.N.& Friend,D.S.(1969):High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells,J.Cell Biol. 43,506-520

Bissell,D.M.,Hammaker,L.E.& Meyer,U.A.(1973):Parenchymal cells from adult rat liver in nonproliferating monolayer culture,I.Functional Studies,J.Cell Biol. 59,722-734

Bonney,R.J.,Becker,E.J.,Walker,P.R.& Potter,v.R.(1974): Primary monolayer cultures of adult rat liver parenchymal cells suitable for study of the regulation of enzyme synthesis,In vitro 9,399-413

Bortz,W.M.(1968):Noradrenalin-induced increase in hepatic cholesterol synthesis and its blockade by puromycin,Biochim.Biophys.Acta 152,619-626

Breslow,J.L.,Lothrop,D.A.,Clowes,A.W.& Lux,S.E.(1977): Lipoprotein regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in rat liver cell cultures,J.Biol.Chem. 252,2726-2733

Brown,M.S.,Dana,S.E. & Goldstein,J.L.(1974):Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in cultured human fibroblasts,J.Biol.Chem. 249,789-796

Brown,M.S.,Faust,I.R.& Goldstein,I.L.(1975):Role of the low density lipoprotein receptor in regulating the content of free and esterified cholesterol in human fibroblasts,J.Clin.Invest. 95,783-793

Brown,M.S.& Goldstein,I.L.(1976):Receptor-mediated control of cholesterol metabolism,Science 191,150-154

Buschiazzo,H.,Exton,J.H.& Park,C.R.(1970):Effects of glucose on glycogen synthetase,phosphorylase and glycogen deposition in the perfused rat liver, Proc.Natl. Cad.Sci.USA 65,383-387

Butcher,R.W.,Baird,C.E.& Sutherland,E.W.(1968):Effects of lipolytic and antilipolytic substances on adenosine 3',5'-monophosphate levels in isolated fat cells,J. Biol.Chem. 243,1705-1712

Butcher,R.W.& Baird,E.C.(1968):Effects of prostaglandins on adenosine 3',5'-monophosphate levels in fat and other tissues,J.Biol.Chem. 243,1713-1717

Butcher,R.W.,Robison,G.A.,Hardman,I.G.& Sutherland,E.W. (1968):The role of cyclic AMP in hormone actions,Advan. Enzyme Reg. 6,357-389

Cavenee,W.K.& Melnykovych,G.(1977):Induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in HeLa cells by glucocorticoids,J.Biol.Chem. 252,3272-3276

Cavenee,W.K.& Melnykovych,G.(1979):Elevation of HeLa cell 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity by glucocorticoids:possible relationship to the cell cycle,J.Cell Physiol. 98,199-212

Chan,T.M.& Exton,J.H.(1976):A rapid method for the

determination of glycogen content and radioactivity in small quantities of tissue or isolated hepatocytes, Anal.Biochem. 71,96-105

Chen,R.F.(1967):Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment,J.Biol.Chem. 242,173-181

Davis,R.A.,Engelhorn,S.C.,Pangburn,S.H.,Weinstein,D.B. & Steinberg,D.(1979):Very low density lipoprotein synthesis and secretion by cultured rat hepatocytes, J.Biol.Chem. 254,2010-2016

Decad,G.M.,Ilsieh,D.P.H.& Byard,J.L.(1977):Maintenance of cytochrome P-450 and metabolism of aflatoxin B_1 in primary hepatocyte cultures,Biochem.Biophys.Res. Comm. 78,279-287

Dempsey,M.E.(1974):Regulation of steroid biosynthesis. In: Annual Review of Biochemistry(Snell,E.E.,Boyer,P.D., Meister,A.& Richardson,C.C.,Hrsg.),43,967-990,Annual reviews inc.,Palo Alto/ California

Desbuquois,B.,Krug,F.& Cuatrecasas,P.(1974):Inhibitors of glucagon inactivation;Effect on glucagon-receptor interactions and glucagon-stimulated adenylate cyclase activity in liver cell membranes,Biochim.Biophys.Acta 343,101-120

Diamondstone,T.I.(1966):Assay of tyrosine transaminase activity by conversion of p-hydroxy-phenylpyruvate to p-hydroxybenzaldehyde,Anal.Biochem. 16,395-401

Dugan,R.E.,Hess,G.C.,Lakshmanan,M.R.,Nepokroeff,C.M. & Porter,J.W.(1974):Regulation of hepatic ß-hydroxy-

ß-methylglutaryl coenzyme A reductase by the interplay of hormones,Arch.Biochem.Biophys. 161,499-504
Edwards,P.A.(1975):The influence of catecholamines and cyclic AMP on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and lipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes,Arch.Biochem.Biophys. 170,188-203
Edwards,P.A.,Fogelman,A.M.& Popják,G.(1976):A direct relationship between the amount of sterol lost from rat hepatocytes and the increase in activity of HMG-CoA reductase,Biochem.Biophys.Res.Comm. 68,64-69
Ernest,M.J.,Chen,Ch.-L.& Feigelson,P.(1977):Induction of tyrosine aminotransferase synthesis in isolated liver cell suspensions;absolute dependence of induction on glucocorticoids and glucagon or cyclic AMP,J.Biol. Chem. 252,6783-6791
Exton,J.H.(1972):Gluconeogenesis,Metabolism 21,945-989
Exton,J.H.& Park,C.R.(1965):Control of gluconeogenesis in the perfused liver of normal and adrenalectomized rats,J.Biol.Chem. 240,955-957
Exton,J.H.,Robison,G.A.,Sutherland,E.W.& Park,C.R. (1971):Studies on the role of adenosine 3',5'-monophosphate in the hepatic actions of glucagon and catecholamines,J.Biol.Chem. 246,6166-6177
Faust,J.R.,Goldstein,J.L.& Brown,M.S.(1977):Receptor-mediated uptake of low density lipoprotein and utilization of its cholesterol for steroid synthesis in cultured mouse adrenal cells,J.Biol.Chem. 252,4861-4871
Garrison,J.C.& Haynes,R.C.,Jr.(1973):Hormonal control

of glycogenolysis and gluconeogenesis in isolated rat liver cells,J.Biol.Chem. 248,5333-5343
Gebhardt,R.,Bellemann,P.& Mecke,D.(1978):Metabolic and enzymatic characteristics of adult rat liver parenchymal cells in non-proliferating primary monolayer cultures,Exp.Cell Res. 112,431-441
Gebhardt,R.& Mecke,D.(1979):Permissive effect of dexamethasone on glucagon induction of urea-cycle enzymes in perifused primary monolayer cultures of rat hepatocytes,Eur.J.Biochem. 97,29-35
Gerschenson,L.E.,Davidson,M.B.& Andersson,M.(1974): Hormonal regulation of rat liver cells cultured in chemically defined medium,Eur.J.Biochem. 41,139-148
Gerschenson,L.E.,Okigaki,T.,Andersson,M.,Molson,J.& Davidson,M.B.(1972):Fine structural and growth characteristics of cultured rat liver cells,Insulin effects,Exp.Cell Res. 71,49-58
Glinsmann,W.H.,Hern,E.P.& Lynch,A.(1969):Intrinsic regulation of glucose output by rat liver,Am.J.Physiol. 216,698-703
Goh,E.H.& Heimberg,M.(1976):Effect of oleic acid and cholesterol on the activity of hepatic hydroxymethyl-glutaryl coenzyme A reductase,FEBS LETT. 63,209-210
Goh,E.H.& Heimberg,M.(1977):Effects of free fatty acids on activity of hepatic microsomal 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase and on secretion of triglyceride and cholesterol by liver,J.Biol.Chem. 252,2822-2826

Goldstein,J.L.,Dana,S.E.,Faust,I.R.,Beaudet,A.L.& Brown,M.S.(1975):Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein, observations in cultured fibroblasts from a patient with cholesterylester storage disease,J.Biol.Chem. 250,8487-8495

Gries,F.A.,Matschinsky,F.& Wieland,D.(1962):Induktion der ß-Hydroxy-ß-methylglutaryl-Reduktase durch Schilddrüsenhormone,Biochim.Biophys.Acta 56,615-617

Guder,W.,Nolte,I.& Wieland,O.(1968):The influence of thyroid hormones on ß-hydroxy-ß-methylglutaryl-coenzyme A reductase of rat liver,Eur.J.Biochem. 4,273-278

Hamprecht,B.,Nüssler,C.& Lynen,F.(1969):Rhythmic changes of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase activity in livers of fed and fasted rats,FEBS LETT.4, 117-121

Hamprecht,B.,Nüssler,C.,Waltinger,G.& Lynen,F.(1971): Influence of bile acids on the activity of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase,I.Effect of bile acids in vitro and in vivo,Eur.J.Biochem. 18, 10-14

Harken,v.D.R.,Dixon,C.W.& Heimberg,M.(1969):Hepatic lipid metabolism in experimental diabetes,V.The effect of concentration of oleate on metabolism of triglycerides and on ketogenesis,J.Biol.Chem. 244,2278-2285

Hayashi,I.& Sato,G.H.(1976):Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium,

Nature 259,132-134

Hems,R.,Ross,B.D.,Berry,M.N.& Krebs,H.A.(1966): Gluconeogenesis in the perfused rat liver,Biochem. J. 101,284-292

Henning,H.-V.,Seiffert,I.& Seubert,W.(1963):Cortisol induzierter Anstieg der Pyruvatcarboxylaseaktivität in der Rattenleber,Biochim.Biophys.Acta 77,345-348

Illiano,G.,Tell,G.P.E.,Siegel,M.I.& Cuatrecasas,P. (1973):Guanosine 3':5'-cyclic monophosphate and the action of insulin and acetylcholine,Proc.Natl.Acad. Sci.USA 70,2443-2447

Ho,Y.K.,Brown,M.S.,Kayden,H.J.& Goldstein,J.L.(1976): Binding,internalization and hydrolysis of low density lipoprotein in long-term lymphoid cell lines from a normal subject and a patient with homozygous familiar hypercholesterolemia,J.Exp.Med. 144,444-455

Huber,J.,Guder,W.,Latzin,S.& Hamprecht,B.(1973):The influence of insulin and glucagon on hydroxymethyl-glutaryl coenzyme A reductase activity in rat liver, Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 354,795-798

Ingebritsen,T.S.,Lee,H.-S.,Parker,R.A.& Gibson,D.M. (1978):Reversible modulation of the activities of both liver microsomal hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase and its inactivating enzyme.Evidence for regulation by phosphorylation-dephosphorylation, Biochem.Biophys.Res.Comm. 81,1268-1277

Jeejeebhoy,K.N.,Ho,J.,Beckenridge,C.,Bruce-Robertson, A.,Steiner,G.& Jeejeebhoy,J.(1975):Synthesis of VLDL

by isolated rat hepatocytes in suspension,Biochem. Biophys.Res.Comm. 66,1147-1153

Jones,R.S.& Grossman,M.I.(1969):Choleretic effects of secretin and histamine in the dog,Am.J.Physiol. 217,532-535

Jones,R.S.& Grossman,M.I.(1970):Choleretic effects of cholecystokinin,gastrin II and caerulein in the dog,Am.J.Physiol. 219,1014-1018

Kandutsch,A.A.& Packie,R.M.(1970):Comparison of the effects of some C_{27}-,C_{21}-,C_{19}-steroids upon hepatic sterol synthesis and hydroxymethylglutaryl-CoA reductase activity,Arch.Biochem.Biophys. 140,122-130

Kenney,F.T.(1962):Induction of tyrosine-α-ketoglutarate transaminase in rat liver,IV.Evidence for an increase in the rate of enzyme synthesis,J.Biol.Chem. 237, 3495-3498

Kenney,F.T.(1967):Regulation of tyrosine-α-keto-glutarate transaminase in rat liver,V.Repression in growth hormone-treated rats,J.Biol.Chem. 242, 4367-4371

Kissebah,A.H.,Harrigan,P.& Wynn,V.(1973):Mechanism of hypertriglyceridemia associated with contra-ceptive steroids,Hormone Metab.Res. 5,184-190

Kissane,J.M.& Robins,E.(1958):The fluorometric measurement of deoxyribonucleic acid in animal tissues with special reference to the central nervous system,J.Biol.Chem. 233,184-188

Kletzien,R.F.,Pariza,M.W.,Becker,J.E.,Potter,v.R.&

Butcher,F.R.(1976):Induction of amino acid transport in primary cultures of adult rat liver parenchymal cells by insulin,J.Biol.Chem. 251,3014-3020

Koch,K.& Leffert,H.L.(1974):Growth control of differentiated fetal rat hepatocytes in primary monolayer culture,VI.Studies with conditioned medium and its functional interactions with serum factors, J.Cell Biol. 62,780-791

Koch,K.& Leffert,H.L.(1979):Increased sodium ion influx is necessary to initiate rat hepatocyte proliferation,Cell 18,153-163

Kohout,M.,Kohoutova,B.& Heimberg,M.(1971):The regulation of hepatic triglyceride metabolism by free fatty acids,J.Biol.Chem.246,5067-5074

Kuroda,M.& Endo,A.(1977):Inhibition of in vitro cholesterol synthesis by fatty acids,Biochim. Biophys.Acta 486,70-81

Kurtz,D.T.,Sippel,A.E.& Feigelson,P.(1976):Effect of thyroid hormones on the level of the hepatic mRNA for a2u globulin,Biochemistry 15,1031-1036

Laishes,B.A.& Williams,G.M.(1976):Conditions affecting primary cell cultures of functional adult rat hepatocytes,I.The effect of insulin,In vitro 12, 521-532

Laishes,B.A.& Williams,G.M.(1976):Conditions affecting primary cell cultures of functional adult rat hepatocytes,II.Dexamethasone enhanced longevity and maintenance of morphology,In vitro 12,821-832

Lakshmanan,M.R.,Nepokroeff,C.M.,Ness,G.C.,Dugan, R.E.& Porter,J.W.(1973):Stimulation by insulin of rat liver ß-hydroxy-ß-methylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol synthesizing activities, Biochem.Biophys.Res.Comm. 50,704-710

Leffert,H.L.(1974):Growth control of differentiated fetal rat hepatocytes in primary monolayer culture, VII.Hormonal control of DNA synthesis and its possible significance to the problem of liver regeneration, J.Cell Biol. 62,792-801

Leibovitz,A.(1963):The growth and maintenance of tissue-cell cultures in free gas exchange with the atmosphere,Am.J.Hyg. 78,173-180

Levine,R.A.(1974):Effect of prostaglandin E_1 on hepatic cyclic AMP activity,carbohydrate and lipid metabolism,Prostaglandins 6,509-521

Lin,R.C.& Snodgrass,P.J.(1977):A steady state of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in cultered rat liver cells and the increase of its activity by dexamethasone,FEBS LETT. 83,89-92

Michalopoulos,G.& Pitot,H.C.(1975):Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes, Exp.Cell Res. 94,70-78

Michalopoulos,G.,Sattler,C.A.,Sattler,G.L.& Pitot, H.C.(1976):Cytochrome P-450 induction by phenobarbital and 3-methylcholanthrene in primary cultures of hepatocytes,Science 193,907-909

Mitropoulos,K.A.& Balasubramaniam,S.(1976):The

role of glucocorticoids in the regulation of the diurnal rhythm of hepatic ß-hydroxy-ß-methylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol 7α-hydroxylase, Biochem.J. 160,49-55

Mukherjee,S.& Bhose,A.(1968):Studies on estrogen regulation of cholesterol biosynthesis in rat liver microsomes,Biochim.Biophys.Acta 164,357-368

Nepokroeff,C.M.,Lakshmanan,M.R.,Ness,G.C.,Dugan, R.E.& Porter,J.W.(1974):Regulation of the diurnal rhythm of rat liver ß-hydroxy-ß-methylglutaryl coenzyme A reductase activity by insulin,glucagon,cyclic AMP and hydrocortisone,Arch.Biochem.Biophys. 160, 387-393

Ness,G.C.,Dugan,R.E.,Lakshmanan,M.R.,Nepokroeff, C.M.& Porter,J.W.(1973):Stimulation of hepatic ß-hydroxy-ß-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in hypophysectomized rats by L-triiodothyronine,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 70,3839-3842

Ogawa,K.,Yokojimo,A.& Ichihara,A.(1970):Transaminase of branched chain amino acids,VII.Comparative studies on isozymes of ascites hepatoma and various normal tissues of rat,J.Biochem. 68,901-911

Oliver,I.T.,Edwards,A.M.& Pitot,H.C.(1978):Hormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in primary cultures of adult rat liver parenchymal cells,Eur.J.Biochem. 87,221-227

Oppenheimer,J.H.(1979):Thyroid hormone action at the cellular level,Science 203,971-979

Pickhart,L.& Thaler,M.M.(1973):Tripeptid in human serum which prolongs survival of normal liver cells and stimulates growth in neoplastic liver,Nature 243,85-87

Rawat,A.K.(1968):Effects of ethanol infusion on the redox state and metabolite levels in rat liver in vivo,Eur.J.Biochem. 6,585-592

Richman,R.A.,Claus,T.H.,Pilkis,S.J.& Friedman,D.L. (1976):Hormonal stimulation of DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes,Proc. Natl.Acad.Sci.USA 73,3589-3593

Riggs,T.R.& Walker,L.M.(1969):Growth hormone stimulation of amino acid transport into rat tissues in vivo, J.Biol.Chem. 235,3603-3607

Rodwell,V.W.,Nordstrom,I.L.& Mitschelen,I.I.(1976): Regulation of HMG-CoA reductase,Advan.Lipid Res. 14,1-74

Ross,B.D.,Hems,R.& Krebs,H.A.(1967):The rate of gluconeogenesis from various precursors in the perfused rat liver,Biochem.J. 102,942-951

Samuels,H.H.& Tomkins,G.M.(1970):Relation of steroid structure to enzyme induction in hepatoma tissue culture cells,J.Mol.Biol. 52,57-74

Savage,C.R.Jr.& Bonney,R.J.(1978):Extended expression of differentiated function in primary cultures of adult liver parenchymal cells maintained on nitrocellulose filters,Exp.Cell Res. 114,307-315

Scheig,R.& Klatskin,G.(1968):Hepatic metabolism of 1-^{14}C octanoic and 1-^{14}C palmitic acids,J.Amer.Oil Chem.Soc. 45,31-33

Seglen,P.O.(1977):Protein-catabolic state of isolated rat hepatocytes,Biochim.Biophys.Acta 496,182-191

Shapiro,D.J.& Rodwell,V.W.(1971):Regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol synthesis,J.Biol.Chem. 246,3210-3216

Siperstein,M.D.& Fagan,V.M.(1966):Feedback control of mevalonate synthesis by dietary cholesterol, J.Biol.Chem. 241,602-609

Staib,W.& Scholz,R.(1968):Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber (Staib,W.& Scholz,R.),Springer-Verlag,Berlin

Start,C.& Newsholme,E.A.(1968):The effects of starvation and alloxan-diabetes on the contents of citrate and other metabolic intermediates in rat liver, Biochem.J. 107,411-415

Tanaka,K.,Sato,M.,Tomita,Y.& Ichihara,A.(1978): Biochemical studies on liver functions in primary cultured hepatocytes of adult rats,I.Hormonal effects on cell viability and protein synthesis,J.Biochem. 84,937-946

Tata,I.R.,Ernster,L.,Lindberg,D.,Arrhenius,E., Pedersen,S.& Hedman,R.(1963):The action of thyroid hormones at the cell level,Biochem.J. 86,408-428

Tata,I.R.& Widnell,C.C.(1966):Ribonucleic acid synthesis during the early action of thyroid hormones,

Biochem.J. 98,604-620

Wagle,S.R.,Hofmann,F.& Decker,K.(1976):Studies on urea synthesis,insulin degradation and phagocytosis by isolated rat kupffer cells,Biochem.Biophys.Res.Comm. 72,448-455

Wagle,S.R.,Ingebretsen,W.R.Jr.&Sampson,L.(1973):Studies on the in vitro effects of insulin on glycogen synthesis and ultrastructure in isolated rat liver hepatocytes, Biochem.Biophys.Res.Comm. 53,937-943

Walker,P.R.(1976):Glycogen metabolism in adult rat liver parenchymal cell primary cultures,J.Cell Physiol. 91,169-180

Walker,P.R.,Bonney,R.J.,Becker,J.E.,Potter,v.R.(1972): Pyruvate kinase,hexokinase and aldolase isozymes in rat liver cells in culture,In vitro 8,107-114

Walter,P.(1976):Pyruvatcarboxylase:Intracellular localization and regulation in Gluconeogenesis:Its Regulation in Mammalian Species(Hanson,R.W.,Mehlman, M.A.),239-265,John Wiley & Sons,New York

Wanson,J.C.,Drochmans,P.,Popowski,A.& Mosselmans,R. (1974):Hepatocytes from adult rats in monolayer culture:ultrastructural aspects and enzymatic functions related to glycogen metabolism,Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 355,1265-1266

Weber,G.,Singhal,R.L.& Srivastava,S.K.(1965):Action of glucocorticoid as inducer and insulin as supressor of biosynthesis of hepatic gluconeogenic enzymes, Advan.Enzyme Reg. 3,43-75

Weber,G.,Singhal,R.L.& Srivastava,S.K.(1965):Insulin: suppressor of biosynthesis of hepatic gluconeogenic enzymes,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 53,96-104

Williams,G.M.(1976):Primary and long-term culture of adult rat liver epithelial cells,Methods Cell Biol. 31, 357-364

Williamson,J.R.(1967):Effects of fatty acids,glucagon and anti-insulin serum on the control of gluco-genesis and ketogenesis in rat liver,Advan.Enzyme Reg. 5,229-255

Yamashita,K.& Field,J.B.(1972):Elevation of cyclic guanosine 3',5'-monophosphate levels in dog slices caused by acetylcholine and sodium fluoride,J.Biol. Chem. 247,7062-7066

Lebenslauf

Ich wurde am 4.4.1953 als einzige Tochter des Destillateurs und Laboranten Heinz Artur Kurt Hillmar und dessen Ehefrau Ilse Martha,geb. Prautzsch in Wuppertal/Elberfeld geboren.
1972 legte ich am Staatlichen Karolinen-Gymnasium Rosenheim das Abitur ab.
Im selben Jahr wurde ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Fächer Biologie und Chemie immatrikuliert.
Die Diplomarbeit mit dem Titel "Vergleichende Untersuchungen an vor-und frühgeschichtlichem Knochenmaterial verschiedener Lagerstätten hinsichtlich Kollagen-Gehalt und - Beschaffenheit" wurde unter Leitung von Prof.Dr.Ziegelmeyer und Dr.Müller am Max-Planck Institut für Biochemie/ Martinsried angefertigt.
Am 27.4.1977 habe ich die Diplom-Biologen Hauptprüfung gemäß der Prüfungsordnung vom 5.3.1974 an der Universität München bestanden.
Von Mai 1977 bis Januar 1980 habe ich an der Medizinischen Poliklinik der Universität München unter Leitung von Prof.Dr.Barth das vorliegende Thema "Untersuchungen zur Erhaltung leberspezifischer Funktionen und zur Regulation der Cholesterolbiosynthese in Primärkulturen von Hepatozyten erwachsener Ratten" bearbeitet.